
CREACIÓ D'UN CONSORCI DE MICROORGANISMES PER L'ELIMINACIÓ DE FÒSFOR A PARTIR DE FONTS DE CARBONI ALTERNATIVES

Projecte de final de carrera de Ciències Ambientals

Departament d'enginyeria química

Universitat Autònoma de Barcelona



AUTORA DEL PROJECTE: HELENA GUASCH BALCELLS

DIRECTORS: ALBERT GUIASOLA CANUDAS I CARLOTA TAYÀ CRISTELLYS

BELLATERRA, JUNY DEL 2012

AGRAÏMENTS

En primer lloc m'agradaria agrair als meus tutors Albert i Carlota per haver-me donat la oportunitat de treballar amb ells. Especialment a tu Carlota per haver aguantat el dia a dia amb mi al laboratori i haver-me estat tant a sobre per explicar-me les coses.

En segon lloc a la meva família, especialment als meus pares, per donar-me ànims en els moments que més ho he necessitat al llarg de la carrera i especialment aquest darrer any.

Per últim, al Marc i els altres amics del dia a dia, que m'han ajudat a evadir-me quan tocava.

1.INTRODUCCIÓ.....	5
1.1. La problemàtica de les aigües residuals	5
1.1.1.Tractament de les aigües residuals	6
1.1.2. Legislació relacionada	8
1.2. El fòsfor.....	10
1.2.2. Eliminació de fòsfor de les aigües residuals	11
1.3. La font de C en el procés EBPR	15
1.3.1. Problematica de la font de carboni	15
1.3.2.Metabolisme de biomassa de digestió anaeròbia	16
1.3.3 Metanol com a font de carboni	18
2. OBJECTIUS.....	19
3. MATERIAL I MÈTODES.....	20
3.1. Material.....	20
3.1.1. Equipament planta pilot	20
3.1.2. Material anàlisi químic	20
3.1.3. Material pels experiments en discontinu	22
3.1.4. Biomassa	22
3.2. Mètodes.....	22
3.2.1. Descripció de la planta pilot	22
3.2.2. Preparació de medis	23
3.2.3. Condicions d'operació dels SBR	24
3.2.4. Monitorització i control	27
3.2.5. Anàlisi químic	28
3.2.6. Metodologia experiments en discontinu	35

4. RESULTATS.....	36
4.1. Interpretacions generals.....	36
4.1.1. Procediment dels experiments	37
4.1.2. Lectura de dades del seguiment d'un cicle	38
4.2 Experiment primer.....	40
4.3. Experiment segon.....	45
4.3.1. Anàlisi de Polihidroxiacanoats	51
4.3.2. Hibridació in –situ fluorescent(FISH)	53
4.4. Experiments en discontinu.....	54
4.4.1. Experiments en discontinu (PAO-propioníc)	55
4.4.2.Experiments en discontinu (consorci)	56
4.4.3. PHA experiments en discontinu	57
5. CONCLUSIONS.....	60
6. BIBLIOGRAFIA.....	61
7. ANNEXES.....	64
7.1. Pressupost.....	64
7.1.1. Materials i equips	64
7.1.2. Despesa personal	66
7.1.3. Energia	67
7.2. Planificació del treball.....	68
7.3. Figures complementàries.....	69
7.4. Índex de figures i taules.....	70
7.5. Acrònims i paraules clau.....	72

1.INTRODUCCIÓ

1.1. La problemàtica de les aigües residuals

Dins de la problemàtica general de la contaminació del medi ambient, la contaminació de l'aigua i conseqüentment dels sistemes aquàtics és de gran importància, ja que són aquests un factor fonamental tant pel desenvolupament de l'ésser humà com per la resta de formes de vida.

Amb l'augment de la utilització de l'aigua, tant en l'àmbit domèstic com en l'àmbit industrial, ha augmentat també la quantitat d'aigua residual generada i habitualment contaminada. Les característiques d'aquestes aigües poden ser molt variables així com els efectes de la seva contaminació (contaminants físics, químics...). Per exemple en una aigua amb una gran quantitat de sòlids en suspensió, s'hi veurà limitat el pas de la llum i desafavorirà el desenvolupament de la vida aquàtica. Un altre exemple seria la toxicitat causada per determinats compostos emergents, degut a la creixent producció de nous productes industrials i farmacèutics, estant aquests poc tractats per les estacions depuradores ja que encara no estan del tot regulats.

També es pot derivar contaminació deguda a l'abocament de substàncies orgàniques o nutrients en les aigües. Concretament, el nitrogen i el fòsfor, són els nutrients més abundants a les aigües residuals i alhora els de major importància per al desenvolupament de la major part de formes vida.

Aquests, en ser abocats en grans concentracions en els medis aquàtics, són els causants de l'acceleració de l'eutrofització. És a dir que, al ser requerits en grans quantitats per la major part d'espècies aquàtiques, la presència de grans concentracions d'aquests nutrients, incentiva la proliferació d'algues superficials de forma accelerada amb el conseqüent augment d'oxigen dissolt degut a la fotosíntesi d'aquestes. A mesura que augmenta la quantitat d'algues superficials, es dificulta el pas de la llum dins el medi provocant la mort de les plantes aquàtiques i posteriorment els animals que s'alimenten d'elles, etc.

A la llarga es crea una situació on la part superior del medi és molt oxidant i la part inferior molt anaeròbia degut al consum massiu de l'oxigen per part de les bactèries descomponedores. A més, es formen també substàncies reduïdes com H_2S o amoníac degut a l'activitat de les bactèries anaeròbies. La greu disminució de la biodiversitat d'aquests ambients fa que es consideri una important font de contaminació que es necessari controlar, ja que la majoria de vegades es deriva d'actuacions antròpiques.

Així doncs, la problemàtica associada al vessament de les aigües col·lectades en sistemes tant urbans com industrials, motiva a la necessitat de depurar els efluent residuals que es generen amb les principals finalitats de:

(Martín *et al.* 2006)

- Protegir l'estat ecològic dels medis receptors (embassaments, rius, barrancs, aqüífers, mar, etc.)
- Evitar riscos per la salut pública de la població
- Produir efluent amb característiques físiques, químiques i microbiològiques aptes per la reutilització

1.1.1.Tractament de les aigües residuals

Els tractaments de les aigües venen determinats per les seves característiques **físiques** (color, olor, temperatura, sòlids,,,), **químiques** (pH, oxigen dissolt, potencial redox, demanda química d'oxigen (DQO), concentracions de nutrients, concentracions de metalls pesats, etc) i **biològiques** (quantitat d'organismes patògens, demanda biològica d'oxigen (DBO)) de les aigües i el grau de depuració esperat depenent de si l'aigua s'ha d' abocar a la llera (on cal distingir-ne zones amb protecció especial) o es vol reutilitzar per a fins urbans, industrials, agrícoles, recreatius o ambientals (recàrrec d'aqüífers, reg de boscos, etc). La concentració de cada un dels components que pot contenir l'efluent de sortida ve determinada per la legislació. En les aigües que s'aboquen a la llera es controlen paràmetres com DBO5, DQO, SST, P i N

totals, en canvi a les aigües reutilitzades en controlen altres paràmetres com els nematodes intestinals, *E.coli*, SST i terbolesa.

El tractament es pot dur a terme de varies maneres depenent del volum d'aigua a tractar i la metodologia a seguir. Existeixen, per exemple, sistemes de llacunatge en el que es recull l'aigua i es deixa reposar per tal d'estabilitzar la matèria orgànica mitjançant l'acció de les plantes i microorganismes que habiten en el "llac artificial". Aquesta forma d'"autodepuració" és una forma més respectuosa amb el medi ambient, però només es pot utilitzar per tractar petits cabals d'aigua amb poca càrrega orgànica. El sistema anàleg a aquest, seria l'EDAR convencional, en la que es tracten volums més grans amb més càrrega orgànica, nutrients i altres compostos dissolts. El control dels diferents paràmetres al llarg de les instal·lacions fa possible detectar pics de contaminació i procedir correctament. Es distingeixen tres parts ben diferenciades al llarg del procés de tractament en l'EDAR.

- Tractament primari: és un procediment físic per a l'eliminació de sòlids i matèria en suspensió. S'utilitzen reixes i sistemes d'eliminació per gravetat o suspensió.
- Tractament secundari: en aquesta part del procés es tracten la matèria orgànica biodegradable i els nutrients. És un procés biològic, és a dir, es fa ús de certes comunitats de microorganismes per tal de que consumeixin aquestes substàncies dissoltes, per posteriorment poder eliminar-les de l'aigua i obtenir com a balanç final l'aigua sense els compostos i una quantitat superior de biomassa en forma de fangs. En la configuració del tractament secundari es solen disposar tancs alternant processos aerobis, anaerobis i anòxics en funció dels contaminants a eliminar, amb un decantador final per a separar la biomassa del líquid per tal d'evitar-ne el seu abocament, i retornar-la al sistema o bé eliminar-la mitjançant la purga.
- Tractament terciari: Finalment, s'eliminen tots els compostos que no s'han pogut tractar anteriorment; sals dissoltes, nutrients, patògens, etc majoritàriament amb mètodes químics.

Paral·lelament a la línia d'aigües descrita, es crea també una línia de fangs en la que es processen tots els cossos contaminants i productes de formació que s'han generat al llarg del tractament secundari.

1.1.2. Legislació relacionada

Per a controlar l'abocament d'aigües residuals existeixen una sèrie de normes per adequar a la situació actual al grau de depuració mínim de les aigües residuals.

La **directiva de la Unió Europea 91/271/CEE** de 21 de maig de 1991 sobre tractament d'aigües residuals urbanes estableix dues obligacions clarament diferenciades. En primer lloc, les aglomeracions urbanes hauran de disposar de sistemes col·lectors per la recollida i conducció de les aigües residuals, i en segon lloc, es preveuen diferents tractaments als quals s'haurà de sotmetre l'aigua abans de ser abocada a les aigües continentals o marítimes.

En la determinació dels tractaments a què hauran de ser sotmeses les aigües residuals urbanes abans del seu abocament, s'ha de tenir en compte si aquest s'efectuarà es “zones sensibles” o “zones menys sensibles”, el qual determinarà un tractament més o menys rigorós.

S'entendrà com a “zones sensibles” aquelles masses d'aigua dolça, estuaris i aigües costaneres que siguin eutròfiques o que puguin arribar a ser-ho en un futur pròxim. També ho seran aquelles masses d'aigua dolça superficial destinades a l'obtenció d'aigua potable i que puguin contenir una concentració de nitrats superior a la admissible.

Les “zones menys sensibles” seran els medis o zones d'aigua marina que l'abocament d'aigua residual no tingui efectes negatius sobre el medi ambient degut a la morfologia, hidrologia o condicions hidràuliques específiques existents en aquesta zona (*Directiva 91/271/CEE*).

Per altra banda hi ha la **Directiva 2000/60/CE**, coneguda com a directiva marc de l'aigua(DMA), per la qual s'estableix un marc comunitari d'actuació en l'àmbit de la política d'aigües adreçada la gestió sostenible i a la protecció de

les aigües, i que pretén aconseguir abans de l'any 2015, un bon estat ecològic de les masses d'aigua superficials mitjançant el desenvolupament de mesures de protecció, millora i regeneració d'aquestes masses.

A Espanya, la directiva 91/271/CEE va ser transposada mitjançant el Real Decret-Llei 11/1995 i el Real Decret 509/1996. En aquesta igual que en la directiva 91/219/CEE es té en compte l'eutrofització definint zones sensibles propenses a aquest fenomen i zones menys sensibles.

L'Administració General de l'Estat, declaren les "zones sensibles" les conques hidrogràfiques que excedeixen de l'àmbit territorial d'una comunitat Autònoma, Les Comunitats Autònomes efectuaran aquesta declaració en els casos restants, i determinaran les "zones menys sensibles" les aigües marítimes.

Pel que fa a Catalunya, l'aplicació de la normativa es duu a terme mitjançant el Pla de sanejament, aprovat pel parlament el 21 de juny del 1996. El Programa de Sanejament d'Aigües Residuals Urbanes 2005 (PSARU 2005) és un instrument de la planificació hidrològica que desenvolupa el Pla de Sanejament de Catalunya aprovat pel Govern de la Generalitat, en data 7 de novembre de 1995, que té com a objecte la definició de totes les actuacions destinades a la reducció de la contaminació originada per l'ús domèstic de l'aigua, que permetin l'assoliment dels objectius de qualitat de l'aigua.

Pel que fa a l'aplicació de la DMA, s'han fet el pla d'espais fluvials , i el pla de gestió de l'aigua que junta amb un pla de mesures, s'estructura en tres apartats: el Pla de gestió del districte de conca fluvial de Catalunya, el Programa de mesures i les propostes de gestió i mesures al Pla de demarcació de l'Ebre,

Pel que fa als nivells requerits per els efluent de les EDAR segons el RD 509/1996 i tal com estipula la llei de sanejament PSARU 2005 en funció nombre d'habitants equivalents(he) de cada nucli poblacional (P), són els següents:

Taula 1: Concentracions límit de DBO, DBO₅, SST, P i N en els efluents d'EDAR. On p, són poblacions i he, habitants equivalents. Font: RD509/1996

Paràmetre	Tractament secundari Zones menys sensibles		Tractament secundari Zones sensibles		Tractament primari
	Concentració	Percentatge de reducció	Concentració	Percentatge de reducció	Percentatge de reducció
DBO ₅ mg·L ⁻¹ d'O ₂	25	70%-90%	25	70%-90%	20%
DQO mg·L ⁻¹ d'O ₂	125	75%	125	75%	
SST (mg·L ⁻¹)	60(2.0000<P<10.000) o 35 (P>1.000)	90% - 70%	60 (2.0000<P<10.000) o 35 (P>1.000)	90% - 70%	50%
Fòsfor total (mg·L ⁻¹) P			2 (10.000<P<100.000 he) 1 (P>100.000 he)	80%	
Nitrogen total (mg·L ⁻¹) N			15 (10.000<P<100.000 he) 10(P > 100.000)	70% - 80%	

1.2. El fòsfor

El fòsfor és un nutrient essencial per les plantes i els animals en la forma de ions PO_4^{3-} i HPO_4^{2-} . Forma part de les molècules de DNA, de les molècules de reserva energètica (ATP i ADP) i dels lípids de les membranes cel·lulars.

Podem trobar el fòsfor en l'aigua, al sòl i als sediments però a diferència de la majoria de cicles de matèria, no es troba fòsfor en estat gasós, fet que fa que tingui un moviment més lent al llarg del seu cicle. És habitual trobar el fòsfor en formacions rocoses i en sediments oceànics com a sals fosfatades. Les fraccions dissoltes d'aquestes sals, són el factor limitant pel creixement vegetal de molts ambients. La baixa solubilitat d'aquestes sals fa que moltes vegades en l'agricultura sigui necessària l'aplicació de fertilitzants. Mitjançant l'absorció de les plantes s'introdueix el fòsfor a la biosfera, que a partir d'aquestes passa a les diferents espècies animals fins que moren i la descomposició retorna el fòsfor al sòl.

Així, en ocasions, s'utilitza el terme fòsfor com a sinònim de fosfat. El fosfat es classifica d'acord a les característiques físiques en dissolt o particulat.

Analíticament es sol utilitzar el criteri de filtració a 0,45 µm (APHA, 1995) per diferenciar les dues fraccions. Segons criteri químic, el fòsfor es classifica en tres fraccions: ortofosfats, polifosfats i fòsfor orgànic. Analíticament es determinen les diferents espècies a partir de la seva transformació a ortofosfats mitjançant hidròlisi àcid (trencament dels polifosfats) i digestió (compostos orgànics), encara que la correspondència entre la classificació química i les fraccions analítiques no és del tot equivalent.

Els ortofosfats són la forma bàsica en la qual es troben els fosfats disponibles pel metabolisme biològic sense cap mena de degradació posterior. En solució aquosa poden tenir diferents formes depenent del pH de la dissolució (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} i H_3PO_4). Els polifosfats són polímers constituïts per dos o més monòmers de fosfats $(\text{PO}_4^{3-})_n$. En solucions aquoses els polifosfats s'hidrolitzen, encara que molt lentament, a la forma d'ortofosfats.

1.2.2. Eliminació de fòsfor de les aigües residuals

S'han desenvolupat diversos esquemes de processos orientats a l'eliminació de fòsfor, ja sigui de manera simultània a l'eliminació de matèria orgànica o en processos separats. Els sistemes de tractament utilitzats es basen en sistemes fisicoquímics, biològics i combinats. L'elecció de l'alternativa a utilitzar depèn dels objectius a complir en la qualitat de l'efluent, de la flexibilitat, de funcionament i dels costos.

1.2.2.1. Eliminació fisicoquímica

Aquesta tècnica consisteix en l'addició de sals d'alumini, calci o ferro, per tal d'eliminar el fòsfor a través de la formació de sals insolubles o de baixa solubilitat. Les sals més comuns són $\text{Al}_2\text{SO}_4 \cdot 14 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{OAl}_2\text{O}_3$ (aluminat de sodi), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (cal), FeCl_3 (clorur fèrric), FeCl_2 (clorur ferrós) i FeSO_4 (sulfat ferrós).

El producte a utilitzar depèn de factors com el nivell de fòsfor en l'influent, l'alcalinitat de l'aigua, el cost econòmic i les instal·lacions de fangs de les que es disposa. L'addició pot tenir lloc abans, després o en el mateix tractament biològic. Aquest ha estat el mètode més utilitzat fins ara degut a la seva facilitat i la seva gran estabilitat. No obstant, aquesta alternativa presenta grans inconvenients: el cost econòmic dels reactius i dels productes que s'afegeixen a posteriori per modificar el pH, les grans quantitats de fangs produïts (tant majors com menor siguin els requeriments de fòsfor residual), la toxicitat dels reactius i dels llots generats per la seva posterior reutilització i el dèficit de fòsfor necessari per cobrir les necessitat biològiques dels microorganismes en el tractament biològic de l'EDAR.

1.2.2.2. Eliminació biològica

Aquest procés consisteix en l'eliminació de fòsfor realitzant un procés biològic a partir dels llots actius, en el que es condiona la biomassa per tal de que aquesta acumuli major quantitat de fòsfor (valors entre un 5-17% del pes sec) (Sato *et al.* 1992) en forma de grànuls de polifosfat, valors molt per sobre dels nivells requerits per satisfer les seves necessitats biològiques (valors entre 1.5 i 2% del pes sec). Els microorganismes amb els que s'enriqueix aquesta biomassa son els Polyphosphate Accumulating Organisms, que d'ara en endavant es referirà a ells com a PAO.

Els PAO requereixen dues condicions diferents per estimular el seu metabolisme d'acumulació de fòsfor. Un primer ambient anaeròbic (sense acceptors d'electrons) amb presència de matèria orgànica fàcilment biodegradable (com àcids grassos volàtils, AGV) i un segon ambient aerobi, tenint com acceptor d'electrons (per exemple l'oxigen) i amb absència de matèria orgànica. Una separació física entre el donador d'electrons (matèria orgànica) i l'acceptor d'electrons (oxigen en la majoria dels casos), és necessària per afavorir els PAO davant d'altres microorganismes.

El sistema de tractament d'aigües que utilitza aquesta alternativa s'anomena "Enhanced Biological Phosphorus Removal" (EBPR). L'avantatge principal d'aquest sistema és la capacitat de produir un efluent amb una concentració de fòsfor menor a 2 mg P/L i una menor producció de fangs respecte al sistema de precipitació química. Aquest sistema està acceptat com un dels més econòmics i sostenibles per a l'eliminació de fòsfor en aigües residuals (Metcalf i Eddy, 1995).

1.2.2.3. Revisió històrica de l'EBPR

Els investigadors que plantejaren la possibilitat de que a partir d'un procés de llots actius es pogués eliminar biològicament fòsfor van ser Grennburg *et al.* (1955). Aportaren un llistat d'elements necessaris perquè el procés funcionés, com ara el requeriment d'una zona anaeròbia abans de l'aeròbia i la necessitat d'excloure l'oxigen, el nitrat i el nitrit de la fase anaeròbica.

Levin i Shapiro (1965) van realitzar investigacions intensives sobre el procés d'alliberació i acumulació de fòsfor. Van aportar dades per afirmar que el procés era biològic i que no requeria de precipitació química. També van observar, en investigacions posteriors, que es tractava d'un procés reversible. D'aquesta manera, Shapiro va ser el predecessor de la configuració comercial denominada Phastrip, que va ser aplicada als EEUU als anys 70, Barnard (1974) va publicar les pautes a seguir per dur a terme l'EBPR exitosament, emfatitzant la importància d'alternar zones anaeròbies-aeròbies. La incorporació de les zones anaeròbies demostrà l'increment de l'eliminació de fòsfor en plantes de llots actius (Barnard *et al.* (1976); Davelaar *et al.* (1978).

Nicholls i Osbornn (1979) observaren que certs microorganismes, el gènere *Acinetobacter*, sota condicions anaeròbies presentaven una certa habilitat per transportar acetat a través de la seva paret cel·lular i acumular-lo al seu interior en forma de polihidroxibutirat, utilitzant polifosfats emmagatzemats intracel·lularment com a font d'energia. Varen ser els primers en proposar un model biològic, definint els processos d'emmagatzemament i degradació de la matèria orgànica i polifosfats, els quals intervenien directament en l'eliminació biològica de fòsfor.

Marais *et al.* (1983) recopilaren les observacions realitzades pel que fa a EBPR i van concloure que les principals condicions del procés eren:

- Necessitat d'una zona anaeròbia, lliure d'oxigen i nitrat
- Seqüència d'etapes alternants anaeròbies-aeròbies: l'acumulació de fòsfor té lloc si hi ha alliberació prèviament i si hi ha acceptor d'electrons
- Proporcionar grans quantitats de fonts de carboni ràpidament biodegradables en la etapa anaeròbia
- El creixement de les bactèries es produeix en la fase aeròbia posterior a l'anaeròbia

1.2.2.4. Metabolisme dels PAO

La biomassa està subjecta a condicions alternants anaeròbies i aeròbies-anòxiques per tal d'afavorir el creixement d'aquest microorganismes.

Sota condicions anaeròbies, els PAO capten substrat orgànic (preferentment AGV) produint després polihidoxialcanoats (PHA), el qual és emmagatzemat i utilitzat com a única font de carboni en la següent fase aeròbia-anòxica. Aquest metabolisme és propi d'alguns tipus de bactèries que quan entren en períodes d'estrès nutricional en el medi de cultiu, com per exemple deficiència de nitrogen, fòsfor o oxigen i a la vegada en troben en presència d'una font de carboni i energia en excés, comencen un procés de captació del carboni per tal de produir el polímer com a forma de reserva energètica.

A la vegada, els equivalents de reducció necessaris per la producció de PHA provenen de la degradació de glicogen intern emmagatzemat. L'energia requerida per aquest procés anaerobi és obtinguda en part per la utilització del glicogen però sobretot de la hidròlisi de polifosfat intracel·lular emmagatzemat, resultant de l'alliberació de ortofosfats al medi.

En la fase aeròbia, el PHA s'oxida per al'obtenció d'energia que s'usa per a captar fòsfor, recuperar el glicogen i pel manteniment i creixement de les cèl·lules. Els PAO capten una quantitat excessiva d'ortofosfats per recuperar els nivells d'ATP i polifosfat intracel·lulars.

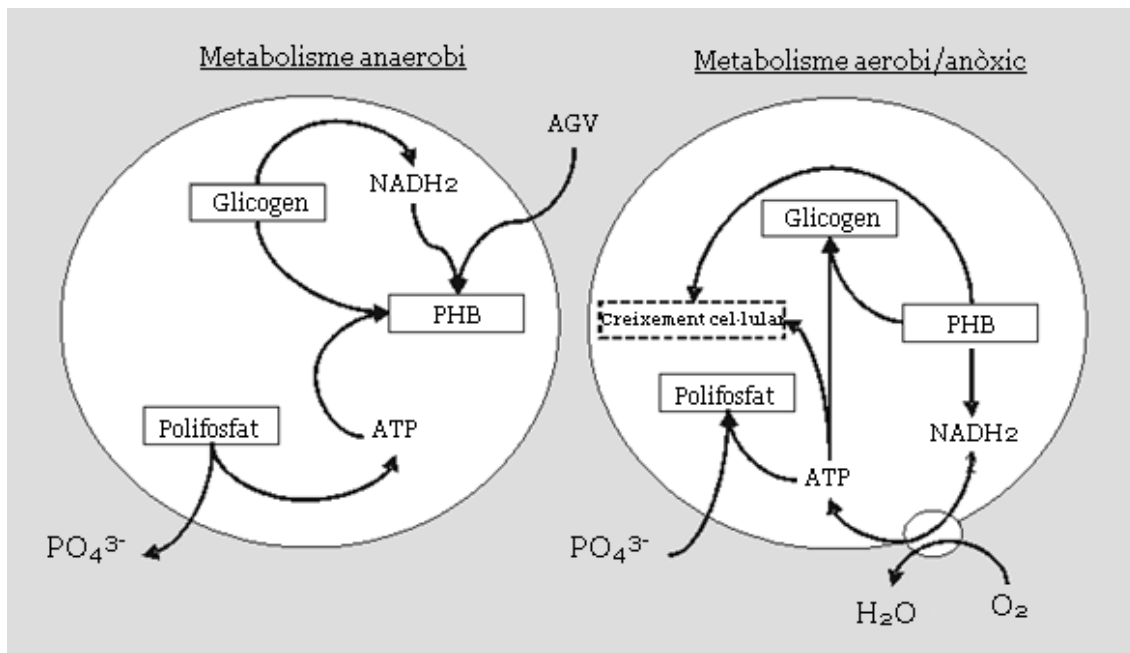


Figura 1: Esquema del metabolisme dels microorganismes PAO

1.3. La font de C en el procés EBPR

1.3.1. Problemàtica de la font de carboni

El carboni que entra en forma dissolta en una depuradora es mesura normalment amb paràmetres de demanda química d'oxigen i demanda biològica d'oxigen (DQO i DBO), que seria la quantitat d'oxigen necessària per oxidar la matèria orgànica en qüestió, químicament i biològicament. Aquesta DQO formada per greixos, proteïnes, carbohidrats, etc, (depenent d'on provenguin les aigües), conté habitualment una fracció molt baixa d'àcids grassos volàtils i la manca d'aquests en l'entrada dificulta l'activitat PAO i consegüentment el procés EBPR en aigües residuals reals.

A més, un altre factor que complica el procés, es el fet de que el tanc anaerobi hagi de situar-se al principi del tractament secundari en l'EDAR. En els múltiples dissenys de configuracions de les EDAR per processos EBPR, es situa el tanc anaerobi al principi del procés ja que es la manera més viable de

poder treballar amb una aigua amb la mínima quantitat d'oxigen i agents oxidants (nitrits i nitrats, producte de processos de nitrificació)

El fet que la fase anaeròbia del cicle dels PAO s' hagi de dur a terme en el primer tanc fa que no es puguin utilitzar com a font de carboni aquells àcids volàtils que són subproducte dels processos que es duen a terme al llarg de l'EDAR de degradació de la DBO i que s'hagi de treballar amb la DQO d'entrada per al procés EBPR. Així doncs, es fa necessària l'addició externa d'aquesta font de carboni, provocant un augment de la càrrega, dels costos operacionals i dels costos de reactius.

1.3.2. Metabolisme de biomassa de digestió anaeròbia

Donada aquesta situació, que per una banda cal situar el reactor anaerobi al principi del tractament secundari en l'EDAR, i per l'altra, que l'aigua residual arriba amb concentracions altes de P, es fa necessari desenvolupar un sistema d'EBPR, amb la finalitat d'obtenir en el mateix medi anaerobi del reactor inicial, generació d'àcids grassos de cadena curta per tal de poder ser consumits pels organismes PAO, i poder evitar així l'addició d'una font externa de carboni.

Així doncs, per a la degradació de la DQO de l'entrada a l'EDAR, s'han d'escollir microorganismes amb un metabolisme amb el qual a partir de matèria orgànica, facin un procés de degradació i en resultin àcids grassos volàtils de cadena curta com a subproducte.

Aquest metabolisme el trobem com a part integrant del procés de digestió anaeròbia. La digestió anaeròbia són un conjunt de processos que encadenats pels quals s'obté com a producte final biogàs i una fracció de matèria orgànica difícilment biodegradable, a partir de la degradació de matèria orgànica i aigua, en condicions anaeròbies. Amb aquest tractament més del 90% de l'energia disponible per oxidació directa es transforma en metà, consumint-se només un 10% de l'energia en creixement bacterià, contrastant amb el 50% consumit en un sistema aerobi (Muñoz *et al.*, 1987). Per tant hi ha baix consum energètic i baixa producció de llots.

Podem dividir el procés en quatre grans etapes en les que actuen diferents grups funcionals de microorganismes:

Hidròlisi: En aquesta etapa la matèria orgànica es “solubilitzada” per exoenzims excretats pels microorganismes hidrolítics, donant lloc a monosacàrids, àcids nucleics, aminoàcids, àcids grassos de cadena llarga i glicerol.

Acidogènesi: En aquesta etapa es dona la formació d'àcids orgànics, principalment àcids grassos volàtils com l'àcid propiònic, el butíric o el succínic, tot i que també altres compostos com àcid làctic, etanol i petites quantitats d'hidrogen gas i diòxid de carboni. Aquests compostos poden provenir de la degradació d'alguns monòmers com també de la degradació de molècules no hidrolitzades prèviament, com alguns lípids. Aquest conjunt de processos són duts a terme pels microorganismes acidògens.

Acetogènesi: En aquesta etapa es redueixen els àcids grassos volàtils i els altres àcids orgànics i es forma acetat. Tot i així, no tot l'acetat prové de la degradació dels àcids per part dels microorganismes acetògens, si no que també en prové una petita fracció de la fermentació d'algunes de les molècules complexes. A més a més hi ha un últim grup de microorganismes anomenats homoacetògens que a partir de CO_2 i H_2 generen el mateix anió acetat.

Metanogènesi: En aquesta etapa es dona la producció dels productes finals, metà i diòxid de carboni. Hi ha varis metabolismes, ja que s'formen tant a partir d'acetat com a partir de l'hidrogen i el diòxid de carboni. També a partir d'alguns productes de la hidròlisi com el metanol i la metilamina.

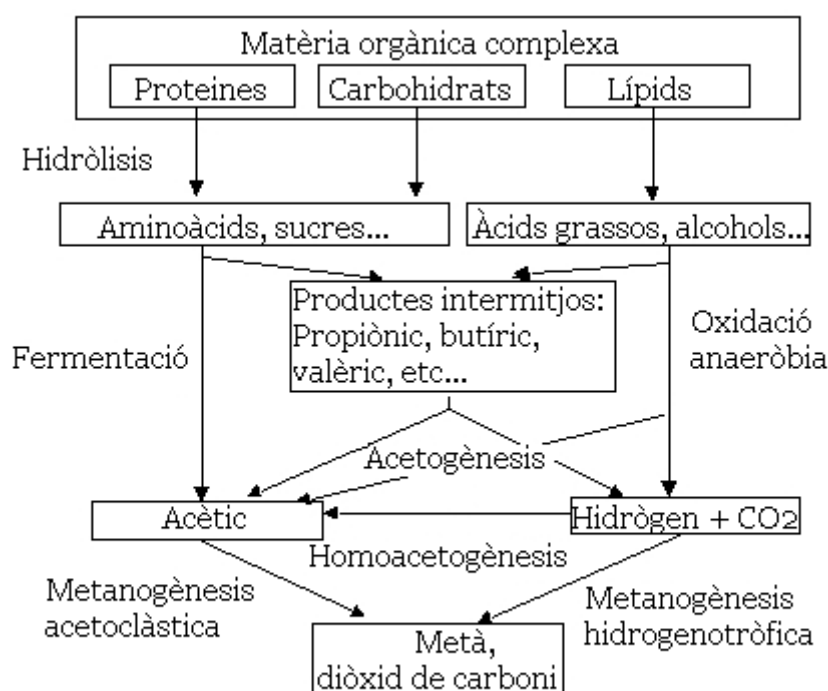


Figura 2: Subprocessos de transformació de la digestió anaeròbia.

Es tracta doncs de fer una selecció dels microorganismes en el conjunt del procés per tal d'obtenir només aquells que generen acetat, hidrolitzant i acidificant la matèria orgànica, i exclouint aquells que captant l'acetat generen biogàs. La obtenció d'aquesta biomassa aïllada en el tanc anaerobi inicial en el procés EBPR, permetria augmentar la concentració de àcids grassos volàtils per la formació d'acetat i posteriorment ser consumits pels organismes PAO i dur a terme l'activitat EBPR.

1.3.3. Metanol com a font de carboni

El metanol és una font de carboni bastant utilitzada en les EDAR. Sovint, en processos on es necessita una aportació de carboni addicional (com ara la desnitrificació), s'utilitza aquest ja que gràcies a la seva simplicitat i al seu preu de mercat bastant baix es el que surt més rentable.

2. OBJECTIUS

Amb la finalitat de millorar el procés EBPR amb microorganismes PAO i adaptar-lo a les condicions reals de les depuradores, es pretén desenvolupar un sistema de funcionament en el que es dugui a terme l'eliminació de fòsfor utilitzant diferents fonts de carboni en general i metanol en aquest cas concret.

Es proposa la creació d'un consorci amb dos grups funcionals de microorganismes. Els primers, acidògens i acetògens, consumeixen metanol, degradant-lo a àcids grassos volàtils, augmentant-ne així la concentració en el tanc anaerobi. Els segons, els PAO, gràcies a l'aportació d'AGV provinent dels microorganismes de digestió anaeròbia, obtenen suficient font de carboni per tal de dur a terme el procés EBPR que consta de dues fases consecutives.

Finalment, un cop la biomassa està ben seleccionada i el consorci funciona correctament, es faran uns experiments en discontinu per provar la viabilitat d'altres fonts de substrat en aquest consorci obtingut per a la obtenció de EBPR amb metanol com a única font de substrat.

3. MATERIAL I MÈTODES

En el següents apartats es descriuran tots els equips, utensilis i productes que s'han utilitzat per a la realització dels experiments, així com els mètodes que s'han seguit per mantenir el funcionament dels reactors amb els que s'han treballat i els procediments que s'han seguit per obtenir, tractar i analitzar les diferents mostres que s'han pres.

3.1. Material

3.1.1. Equipament planta pilot

La planta pilot en la que s'ha treballat, s'ha equipat amb el següent material:

- Reactor tipus SBR (Sequencing Batch Reactor) de 13,5 L, equipat amb un agitador i un difusor
- Bidons de 100 L per alimentar el reactor
- Botelles de 2L amb solució de control de pH (HCl 1M i NaOH 1M)
- Tres bombes dosificadoras de membrana
- Dues bombes peristàltiques
- Sonde de temperatura, potencial redox (Hamilton, Oxytride Platinum), oxigen (Hamilton, Oxyferm 120) i pH (Hamilton, Polilyte Pro 120)
- Bany termostàtic
- Autòmata programable (PLC) per al control del reactor (encesa i apagada de les bombes, velocitat d'agitació, aportació d'oxigen o nitrogen i control redox i de pH)
- Dues electrovàlvules controlades pel PLC que regulen l'aport d'aire i nitrogen al sistema

3.1.2. Material anàlisi químic

Material utilitzat per processar cada una de les mostres:

Preparació mostres (seguiment rutinari)

- Xeringues, filtres millex de 0,2 micròmetres
- Vials de 40 mL per l'anàlisi de P
- Vials 1,5 ml amb tap perforable especials per cromatografia
- Pipetes de 1mL, 1-5 mL i 1-10mL
- Solució conservadora d'AGV

Anàlisi SSV i SST

- Filtres de fibra de vidre
- Estufa 100°C
- Mufla 500°C
- Filtre kitasato

Fluorescent in situ Hybridization (FISH)

- Centrífuga per eppendorfs
- Phosphate buffered saline (PBS) , Paraformaldehid al 4% (PFA), etanol gelat
- Solucions d'etanol al 50%, al 80% i al 98%
- Porta objectes amb pouets
- Solució amortidora d'hibridació
- Solució de sonda

Anàlisi dels Polihidroxialcanoats (PHA)

- Liofilitzador
- Tubs de digestió
- Cloroform, metanol acidificat, sulfat de sodi
- Pipetes pasteur, agitadors mecànic
- Xeringues estèrils de 2 mL
- Filtres millex 4mm de 0,22µm de porus
- Vials 1,5 ml amb tap perforable especials per cromatografia

3.1.3. Material pels experiments en discontinu

- Respiròmetre (envàs de vidre amb entrada d'aire i forats per les sondes de temperatura, oxigen i pH)
- Bureta automàtica per regulació del pH
- Bany tèrmic
- Agitador magnètic
- Entrades d'aire comprimit i N₂
- Ordinador per controlar els cabals de gas i la bureta automàtica

3.1.4. Biomassa

- Fang enriquit en PAO provinent d'una planta ja existent laboratori de la UAB
- Fangs d'un digestor anaerobi (EDAR de Granollers)

3.2. Mètodes

3.2.1. Descripció de la planta pilot

La planta pilot consta de dos reactors de tipus SBR (Sequencing Batch Reactor) completament monitoritzats i controlats per un sistema PLC (SIMATIC S7-226, Siemens).

Cada un dels reactors ha estat inoculat amb una biomassa diferent per la primera fase experimental, El primer (SBR A) amb fangs del digestor anaerobi de Granollers, i el segon (SBR B) amb un fang enriquit amb PAO.

Posteriorment, 4L de la biomassa procedent del SBR B s'han usat per a bioaugmentar l'SBR A (sense canviar cap dels paràmetres de funcionament) per tal de formar el consorci anaerobis-PAO.

3.2.2.Preparació de medis

Els medis sintètics s'han preparat en bidons de 100 L des d'on s'ha bombejat l'aigua sintètica cap al reactor.

Les fonts de carboni eren addicionades mitjançant bombes peristàltiques per separat de la resta de l'aliment sintètic.

Els compostos per l'aigua sintètica de cada biomassa eren els següents:

Taula 2: Concentracions requerides per a la preparació dels medis sintètics dels SBR

	Medi biomassa de digestió anaeròbia	Medi biomassa PAO
Compost	(SBR A)	(SBR B)
Compostos per l'aport de fòsfor : (mg·L ⁻¹)		
KH ₂ PO ₄	108,8	54,4
K ₂ HPO ₄	82,4	41,2
NaHCO ₃	60	30
Macronutrients: (mg·L ⁻¹)		
NH ₄ Cl	200	100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	87,8	43,9
MgCl·6H ₂ O	320	160
CaCl ₂ ·2H ₂ O	84	42
Allylthiourea	10	5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4	0
Solució de micronutrients:		
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,5g	1,5g
H ₃ BO ₃	0,15g	0,15g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,03g	0,03g
KI	0,18g	0,18g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,12g	0,12g
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	0,06g	0,06g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,12g	0,12g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,15g	0,15g
EDTA 0,5M	68,5 mL	68,5 mL
Aigua MiliQ	Enrasar fins a 1L	Enrasar fins a 1L

Per fer més àgil la preparació dels bidons, per l'addició dels compostos de fòsfor i els macronutrients, s'han estat "kits" amb les quantitats necessàries per a 100 litres de medi.

A més s'ha afegit 60mL de solució de micronutrients per cada 100 L de medi de l'SBR A i 30 mL per cada 100 L de medi de l'SBR B.

3.2.3. Condicions d'operació dels SBR

El sistema SBR es un sistema alternatiu de tractament d'aigües en el que només s'utilitza un reactor per a dur-hi a terme totes les fases de la depuració de l'aigua. Aquest sistema permet un control més fàcil i barat a més de tenir menys pèrdues de biomassa a l'efluent.

En el nostre cas, cada cicle té 5 fases: alimentació, fase anaeròbia, fase aeròbia, sedimentació i extracció, dutes a terme per aquest ordre.

La primera de les fases consisteix en l'entrada de l'aigua sintètica i la font de carboni, bombejades per separat, durant els 5 primers minuts del cicle. Seguidament comença la fase anaeròbia, on si es precis s'hi bombolleja N_2 per tal d'eliminar tot l'oxigen que pugui haver en el sistema inicialment. A l'inici d'aquesta fase també s'inicia l'agitació del tanc que és manté també en la fase següent. En la fase aeròbia, es canvia la difusió de N_2 per la d'aire comprimit per tal de mantenir un medi amb una concentració d' O_2 d'uns 3-4 mg•L⁻¹.

Finalment les dues últimes fases es fan en repòs (sense agitador). En els primers 25 minuts, es sedimenten els fangs al fons del tanc per gravetat. Els 5 minuts següents es fa la extracció dels 5 litres de sobrenedant del reactor.

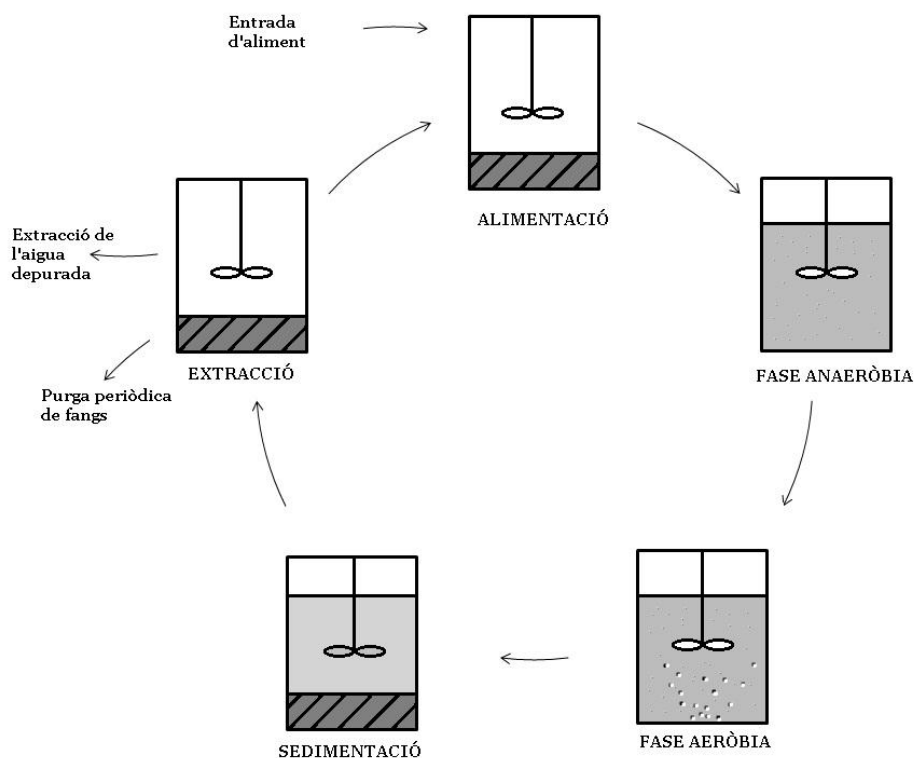


Figura 3: Funcionament del sistema d'SBR

3.2.3.1. Digestió anaeròbia i consorci (SBR A)

Aquest SBR opera en cicles de 8 hores amb un total de 3 cicles al dia. Els temps de les fases anaeròbia i aeròbia han variat al llarg de l'experiment per tal de fer la selecció de la biomassa acetogènica. En la primera configuració, el cicle ha estat completament anaerobi. En la segona, s'ha afegit 30 minuts d'aireació al final de fase anaeròbia per començar a eliminar la població metanògena. Finalment la configuració del reactor queda amb 5h de fase anaeròbia i 2h d'aeròbia, per acabar la selecció dels acetògens i seguidament pel funcionament del consorci PAO-digestió anaeròbia. En aquest reactor les fases de sedimentació i extracció han tingut una durada d'1h.

3.2.3.2. PAO (SBR B)

En el segon SBR opera en cicles de 6 hores amb un total de 4 cicles per dia.

Els cicles també tenen les 5 fases com l'SBR anterior, però en aquest no s'han variat els temps de les fases anaeròbia i aeròbia.

Durant els 5 primers minuts del cicle, en la fase anaeròbia, s'introdueix l'aliment, passades 2h de fase anaeròbia es troba la fase aeròbia amb una durada, en aquest cas de 3,5h. Seguidament es troba la fase sedimentació (25min) i durant els 5 últims minuts del cicle hi ha l'extracció de 5L del sobrenedant.

3.2.3.3. Entrada de la font de C

L'entrada de la font de carboni es fa al sistema durant els primers 5 minuts de cicle (igual que l'aigua sintètica), mitjançant una bomba peristàltica que dona un cabal de 8 mL/min. En el cas de la biomassa de digestió anaeròbia, s'utilitza metanol com a font de carboni. La font de carboni dels PAO, ha variat durant l'experiment entre àcid propiònic i àcid acètic. La raó d'aquests canvis temporals és per afavorir la selecció dels PAO i eliminació dels GAO (*Glycogen accumulating organisms*), directes competidors dels PAO per la font de carboni.

3.2.3.4. Altres paràmetres dels SBRs

El sistema té un temps de residència hidràulic (TRH) de 12 h i un temps de residència cel·lular (TRC) de 14 dies, aconseguint-ho mitjançant una purga periòdica del fang de mescla al final del cicle quan els microorganismes han acumulat tot el fòsfor present al medi.

Per tal d'aconseguir condicions anaeròbies en l'SBR B ha estat necessari minimitzar la transferència superficial d'oxigen. Per això, s'ha aplicat un flux de nitrogen gas durant 1 min cada 10 min durant la fase anaeròbia per mantenir una concentració d'oxigen dissolt al voltant de 0 mg·L⁻¹.

Per altra banda, en la fase aeròbia també s'aplica un flux d'aire fix en els dos SBRs per tal de garantir una bona aeració dels sistemes. La quantitat d'oxigen dissolt (DO) es manté entre 3 i 4 mg·L⁻¹ durant la fase aeròbia.

La temperatura es manté a uns $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, gràcies al bany termostàtic, El pH esdevé constant a $7,5\pm 0,05$ mitjançant l'addició HCl (1M) i NaOH (1M).

3.2.4. Monitorització i control

La monitorització i control dels SBR es realitzen amb el PLC (Siemens SIMATIC S7-226). Aquest sistema permet controlar les bombes d'entrada i sortida, les vàlvules d'aire i nitrogen i l'agitador mecànic. També rep totes les senyals analògiques de mesura (pH, redox, oxigen dissolt i temperatura). Aquest PLC està connectat via RS -232 a un ordinador, el qual monitoritza i emmagatzema les dades rebudes a través d'un software programat amb Visual Basic 6.0.

3.2.4.1. Control pH, titrimetria

La titrimetria és una mesura indirecta de la producció total de protons (HP) d'un determinat procés. L'HP s'obté monitoritzant el perfil de la quantitat d'àcid i base requerida per mantenir el pH constant :

$$HP = V_{BASE} \cdot C_{BASE} - V_{ÀCID} \cdot C_{ÀCID}$$

on la V_{BASE} i $V_{ÀCID}$ són els volums acumulats d'àcid o base addicionats (mL) i C_{BASE} i $C_{ÀCID}$ són les concentració de l'àcid o la base (M).

Aquesta tècnica està sent implementada en SBR mitjançant bombes peristàltiques que afegeixen la quantitat necessària de base o àcid per mantenir el pH constant.

3.2.5. Anàlisi químic

Per tal de controlar el sistema també s'utilitzen anàlisi off-line per determinar la concentració de metanol, àcids grassos volàtils, fòsfor, PHA, etc. presents en

els SBR en un determinat temps. Aquestes analítiques ens permeten tenir el perfil de les concentracions de cada compost al llarg del cicle i així conèixer les condicions del sistema.

3.2.5.1. Presa de mostra i pretractament

Per a un bon seguiment del funcionament del reactor, cal prendre mostra tenint en compte la duració de les etapes principals del cicle (anaeròbia i aeròbia).

Depenent de la duració d'aquestes etapes s'extreuen diferents mostres de manera esglaonada cada cert interval de temps, assegurant que es pregui mostra al temps corresponent a l'inici i final de cadascuna de les fases. És a dir, es prenen mostres a l'inici i el final de la fase anaeròbia i de la fase aeròbia.

Just després de l'extracció de cada mostra és necessari eliminar la biomassa per filtració, per tal d'aturar la reacció i que puguin ser analitzats els diferents paràmetres. Per la filtració s'utilitzen unitats de filtració Millex amb membrana Millipore Express PES (poliètersulfona) i un tamany de porus de 0,22 µm.

Sempre que les mostres no siguin analitzades a continuació han de ser guardades a la nevera a 4°C o bé al congelador depenent de la volatilitat de la substància a analitzar.

3.2.5.2. Anàlisi del metanol i els àcids grassos volàtils

La cromatografia de gasos és una tècnica de separació dels components d'una mescla per facilitar-ne la seva identificació i quantificació. S'utilitzen diferents tècniques per la separació dels components. En concret, a la cromatografia de gasos, es separen compostos amb certa facilitat per ser volatilitzats.

Així doncs, el cromatògraf al prendre la mostra l'escalfa (entre 150 i 250°C) fins a volatilitzar-la, i mitjançant un gas portador (fase mòbil) arrossega la mostra dins la columna. En la columna els diferents analits volatilitzats aniran separant-se a mesura que interaccionin amb la fase estacionària (recobriment de la columna), degut a les propietats físiques de cada un.

Finalment les substàncies separades surten de la columna i passen per un detector (dispositiu que genera un senyal elèctric proporcional a la quantitat de substància eluïda).

El registre d'aquest senyal en funció del temps és el que anomenem cromatograma, on les substàncies apareixen com a pics amb àrees proporcionals a les seves concentracions, fet que possibilita l'anàlisi quantitatiu.

Les mostres s'introdueixen al carret del cromatògraf, filtrades i en uns vials especials estèrils, amb tap perforable. En el cas del AGV s'hi afegeix una solució conservadora per tal de que quedin dissolts en la mostra.

L'equip utilitzat per l'anàlisi del metanol i els àcids grassos volàtils és un Agilent Technologies 7820 A GC equipat amb una columna INNOWAX (30m de longitud x 0,53mm de diàmetre intern x 1µm d'espessor de la pel·lícula interior) i amb un detector de flama d'ionització FID (flame ionisation detector).

El pols de mostra injectada es de 1µl a 50°C, El gas portador és heli.

La temperatura inicial de la columna són 45°C i incrementa a raó de 20°C per minut fins a arribar als 110°. El temps d'elució de la totalitat de la mostra és de 20 minuts.

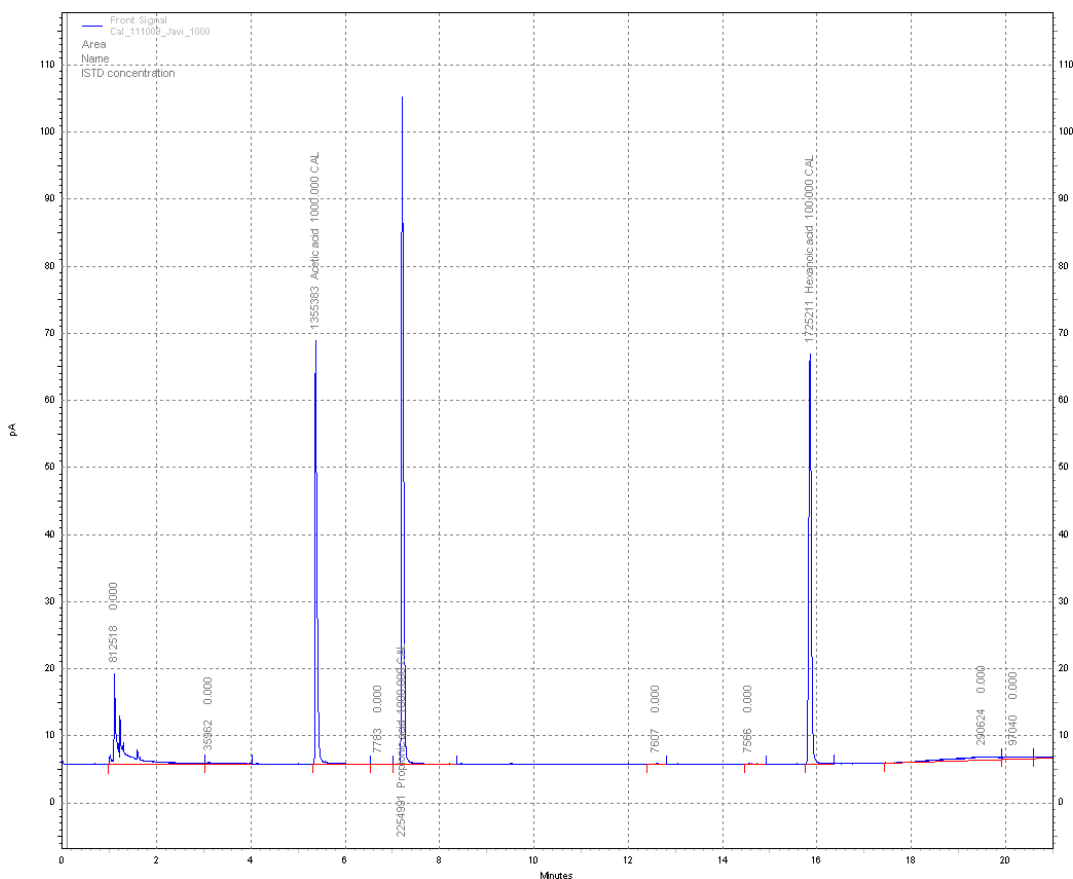


Figura 4: Cromatograma d'anàlisi d'una mostra d'àcids grassos volàtils.

La figura 4 és un cromatograma d'una mostra d'àcids grassos volàtils on es poden visualitzar els temps en que surten de la columna els diferents compostos separats (l'àcid acètic, l'àcid propiònic i l'àcid hexanoic). La concentració de cada un d'aquests compostos es proporcional a l'àrea del pic. Per calcular el valor d'aquesta àrea, cal dur a terme l'anàlisi prèviament amb una mostra de concentracions conegudes per tal de comparar, i que ens permetrà també conèixer el temps de retenció de cada compost dins la columna i elaborar el patró per identificar les mostres desconegudes.

3.2.5.3. Anàlisi del fòsfor

El fòsfor ha estat analitzat amb un equip especial per l'anàlisi in-situ de fòsfor i amoni anomenat PHOSPHAX. L'equip en qüestió utilitza la tècnica de quantificació per colorimetria del vanadat/molibdat. Aquests compostos, en

reaccionar amb els ortofosfats formen un complex de color groc. La quantitat de complex format és proporcional a la quantitat d'ortofosfat i mitjançant un fotòmetre de doble feix, es mesura el color groc específic del complex i es coneix la concentració de PO_4^{3-} de la mostra.

El rang de detecció del PHOSPHAX és de $0,05 - 15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ P-PO}_4^{3-}$, és per això que després de filtrar les mostres amb els filtres Millex de $0,22 \mu\text{m}$, cal diluir-les, ja que en el reactor trobem una concentració de fòsfor de fins a $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.2.5.4. Sòlids en suspensió totals (SST)

Aquesta analítica mesura la quantitat de matèria orgànica i inorgànica en suspensió del sistema per filtració i posterior secar utilitzant filtres de fibra de vidre (APHA, 1995)

El procediment d'aquest anàlisi és:

- Condicionament dels filtres durant 2h a l'estufa a 100°C
- Refredament al dessecador
- Pesada dels filtres amb una balança analítica (P filtre)
- Filtrar 10 ml de cada mostra agitada, amb un matràs Kitasato (V mostra)
- Deixar els filtres a l'estufa fins que arribi a pes constant, aproximadament 2h a 105°C
- Deixar-los refredar al dessecador
- Pesar els filtres amb la balança analítica (P sòlids)
- Determinar la quantitat de sòlids en suspensió ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) segons la equació següent:

$\text{Sòlids en suspensió totals} = (\text{SST}) = [(\text{P sòlids}) - (\text{P filtres})] \cdot V \text{ mostra}^{-1}$

3.2.5.5. Sòlids en suspensió volàtils (SSV)

Es mesura la quantitat de matèria volàtil eliminada, que és assimilable a la quantitat de biomassa del sistema (APHA,1995)

El procediment analític és el següent:

- Procedir igual que en l'anàlisi de sòlid en suspensió (SST)
- Introduir els filtres a la mufla durant 30min a 550°C
- Refredar-los al dessecador
- Pesar els filtres amb la balança analítica (Pmufla)
- Determinar la quantitat de sòlids en suspensió volàtils ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) segons l'equació següent:

$\text{Sòlids en suspensió volàtils} = (\text{SSV}) = [(\text{Psòlids} - (\text{P filtres}) - (\text{P mufla})) \cdot V \text{ mostra}^{-1}$
--

3.2.5.6. Mètode d'anàlisi de FISH

Per a la quantificació de la biomassa d'organismes PAO utilitzem la tècnica d'hibridació in situ per fluorescència, que ens permet quantificar aquells microorganismes dels quals coneixem la seva seqüència d'ADN, mitjançant un recompte en un microscopi confocal. (Amann, 1995)

El procediment d'aquest anàlisi per la fixació de la mostra és:

- Posar 0.5 mL de mostra de cèl·lules (d'una mostra del reactor sedimentada durant 30 minuts aprox. i per tant més concentrada), amb 1.5 mL de PFA (paraformaldehid 4%) un eppendorf de 2 mL
- Deixar refredar el mixte a la nevera a 4°C entre 1 i 3 hores
- Centrifugar la mostra a 3000 rpm i extreure el sobrenedant (PFA), i reomplir l'eppendorf amb PBS (phosphate buffered saline)
- Repetir el procediment de rentat 3 vegades, L'últim rentat cal omplir l'eppendorf amb 0.5mL de PBS i 0.5mL d'etanol-fred
- Guardar les mostres a -20°C

El procediment per aplicar la mostra al portaobjectes és :

- Aplicar 5-20 μL (depenent de la concentració) de mostra fixada en algun dels pous del portaobjectes
- Aplicar aire sec (màxim 60°C)
- Deshidratar les mostres amb 3 solucions d'etanol diferents, aplicant primer la de concentració 50%, en segon lloc la de 80% i finalment la de 98%
- Aplicar aire sec

El procediment per la hibridació de les mostres és:

- Afegir 8 μL de solució amortidora d'hibridació en cada pou del portaobjectes
- Afegir la resta de la solució a un falcon de 50mL per humidificar-lo
- Afegir 0.5 μL de solució sonda i barrejar cautelosament
- Posar el portaobjectes al falcon en horitzontal, de tal manera que no cobreixi
- Tancar el falcon i mantenir-lo a 46°C durant 1-2 hores
- Rentar amb solució salina

Un cop preparades les mostres es poden guardar a -20°C durant diverses setmanes o ser observades directament. Prèviament cal afegir sobre la mostra solució antiblanquejant per millorar la visió.

Per la observació de les mostres cal utilitzar un microscopi làser confocal d'escombrat o d'epifluorescència amb els conjunts de filtres adequats per als colorants units a les sondes.

Mitjançant un programa específic, es prenen fotos dels diferents pous amb diferents ones de llum. La primera foto es pren amb una longitud d'ona que permet veure el blau de tots els microorganismes hibridats (PAO i GAO) i una segona foto on només es veuen els microorganismes hibridats amb la sonda de color rosa (PAO). Es compara les unitats blaves (PAO+ GAO) i roses (PAO) per tal de quantificar les mostres. A més fotos tretes més significatiu és el resultat.

3.2.5.7. Anàlisi PHA

Els PHA són polímers de reserva d'origen bacterià molt comuns que tenen la finalitat d'“emmagatzemar energia” i els trobem en els microorganismes capaços d'eliminar fòsfor.

Amb l'anàlisi del PHA determinem concretament la concentració d'àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric a través de la cromatografia de gasos. El mètode es basa en la metilació de la mostra per la seva detecció.

El procediment que seguim per la preparació de la mostra és:

- Metanol acidificat (10% d'àcid sulfúric)
- 100mg d'àcid benzoic)
- Centrifugar la mostra amb el fang, Extreure el sobrenedant i liofilitzar el fang
- Dipositar 10mg de fang liofilitzat en un tub de pírex de 10 mL amb tap amb junta de tefló
- Afegir 4 mL de metanol acidificat i 4mL de cloroform a cada tub,
- Posar-los a l'estufa a 100°C durant 20 h per que es dugui a terme la metilació
- Extreure 1mL de la fase de cloroform i dipositar-la en un eppendorf que contingui 1g aprox, de sulfat de sodi dessecat. Agitar
- Filtrar la mostra amb el filtre millex de 0,45 micres directament al vial per cromatografia

L'anàlisi es duu a terme amb cromatografia de gasos on les condicions del mètode són:

- Columna INNOWAX (30m de longitud x 0,53mm de diàmetre intern x 1µm d'espessor de la pel·lícula interior)
- Heli com a gas portador
- Temperatura injector 220°C
- Temperatura detector 275°C

La recta de calibrat de l'àcid hidroxi-butíric i l'àcid hidroxi-valèric es fa a partir de la metilació d'un copolímer de l'àcid 3-hidroxi-butíric i del 3-hidroxi-valèric. Per la recta de l'àcid 2-metil-hidroxi-valèric s'utilitza el 2-hidroxi-caproic.

El rang d'anàlisi està entre els 2500 i 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ i la quantificació es fa amb el patró intern (àcid benzoic).

3.2.6. Metodologia experiments en discontinu

En els experiments en discontinu realitzats, s'han utilitzat dos litres de fangs dels SBR, s'han col·locat al respiròmetre juntament amb una sonda d'OD i una de pH. El respiròmetre es col·loca a un bany termostàtic que es el que manté la temperatura a 25°C al medi. Per ajustar el pH, es connecta el sistema al programa FlowView i aquesta es connecta a una microbureta que addiciona àcid i base en les quantitats necessàries per mantenir el pH a $7,5 \pm 0,05$. Al mateix programa també està connectat un cabalímetre que quantifica el cabal d'aire entrant al que es connecta una entrada de N_2 durant la fase anaeròbia i una entrada d'aire comprimit per la fase aeròbia. Aquest darrer sistema permet mantenir el sistema amb una OD de $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durant la fase anaeròbia i una OD d'entre 3 i $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ durant la fase aeròbia. Els pols de la font de carboni s'addicionen al sistema a l'instant 0 min amb una micropipeta. La quantitat varia en funció de la concentració de la cada un dels compostos, ja que l'objectiu és obtenir en l'interior una DQO de $600 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El sistema està agitat mitjançant una mosca i un agitador magnètic que es col·loca sota el bany termostàtic. Aquest cicle a més petita escala permet controlar tots els paràmetres a temps real i més precisament.

4. RESULTATS

4.1. Interpretacions generals

Per tal d'adaptar el sistema d'eliminació biològica de fòsfor a situacions més reals, s'ha plantejat un mètode per tal de que la biomassa PAO pugui alliberar i captar fòsfor a partir de fonts de carboni diferents de les convencionals (acètic o propiònic). Donat que aquesta biomassa consumeix preferentment AGV, s'ha proposat fer un consorci amb PAO, i un altre tipus de biomassa, per tal de que els segons degradin la font complexa donant com a resultat els AGV que necessiten els PAO per tal de poder dur a terme el procés d'eliminació del fòsfor. Així doncs, el resultat global seria l'eliminació biològica de fòsfor usant una font de carboni no convencional. La biomassa que s'ha proposat per la degradació de la font de carboni fins a AGV són microorganismes acetògens i acidògens que cal seleccionar per tal de poder aconseguir un fang amb la màxima concentració d'aquests i amb la menor quantitat possible de microorganismes que desenvolupin altres funcions (metanògens).

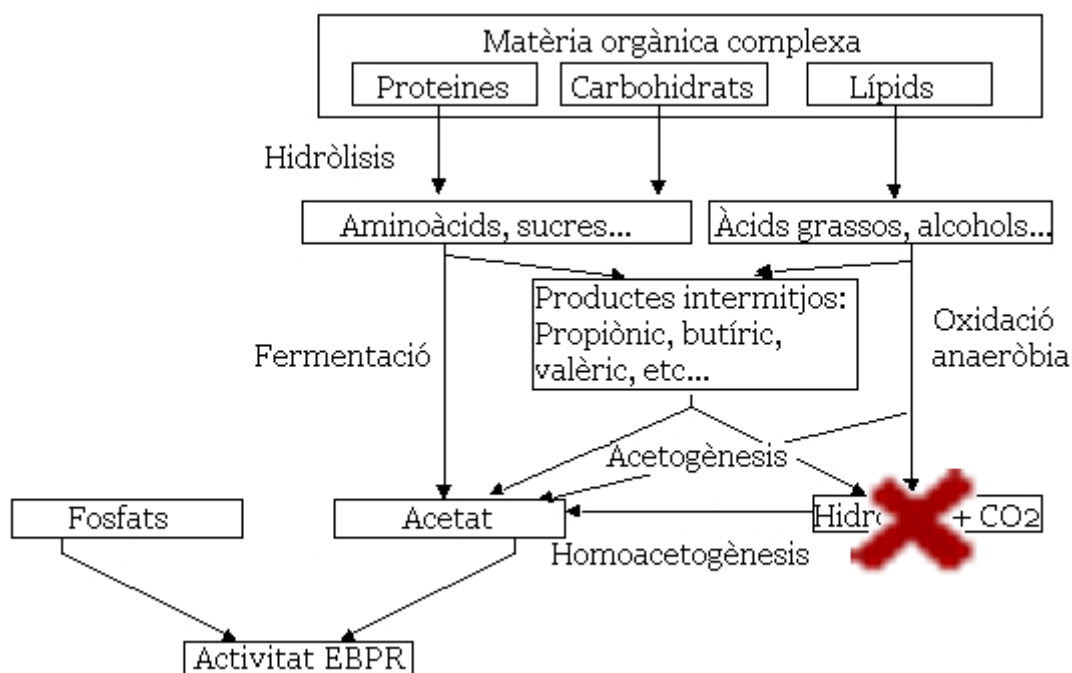


Figura 5: Funcionament del consorci PAO-digestió anaeròbia

4.1.1. Procediment dels experiments: Experiment primer i experiment segon

Per a la creació del consorci PAO-anaerobis, han calgut etapes prèvies per el condicionament de la biomassa en el reactor. Així doncs, a partir de fangs de la depuradora de Granollers s'han anat seleccionant les dues biomasses per separat. El mètode de selecció consisteix en afavorir només les condicions per a que la biomassa desitjada sobrevisqui (aliment, temperatura, OD, pH...). En el cas de la biomassa PAO la selecció la va fer el grup de treball de l'Autònoma a partir de fangs de la mateixa depuradora. Per enriquir aquest tipus de biomassa s'ha d'afavorir el seu creixement respecte dels seus competidors, que són els microorganismes GAO que segueixen el mateix comportament que els PAO encara que no poden acumular fòsfor.

La selecció dels microorganismes acidògens i acetògens a partir del fang de digestió anaeròbia ha estat la part inicial de la preparació del consorci. Aquesta fase de selecció ha estat dividida en tres períodes en els que s'ha aplicat una quantitat diferent d'oxigen en cada una d'elles. Essent la primera totalment anaeròbia i la última la més aeròbia de totes amb dues hores finals d'aireació a cada cicle.

De la gran varietat d'espècies en aquests tipus de llots s'han seleccionat només els acidògens i els acetògens, ja que són aquells que donen lloc a la degradació de les molècules de carboni per obtenir AGV de cadena curta (principalment àcid acètic i propiònic), i exclouren els metanògens.

L'augment gradual d'oxigen dissolt s'aplicà amb l'objectiu d'adaptar els microorganismes acidògens i acetògens a condicions més aeròbies, i exclouren els metanògens del sistema, ja que son anaerobis estrictes i per tant moren amb petites quantitats d'oxigen.

Ha sigut necessari realitzar dues vegades l'experiment, fent canvis en alguns paràmetres, ja que en el primer no s'ha aconseguit eliminar fòsfor un cop fet el consorci amb les dues biomasses.

En el primer experiment, els períodes 1 i 2, de selecció han estat més llargues que en segon experiment, essent de 42 i 14 dies respectivament.

Finalment un cop obtingut el consorci s'han realitzat uns experiments amb discontinu prenent només 2 litres de biomassa per tal de fer el seguiment d'un cicle amb diferents fonts de carboni.

En la taula següent es pot veure quina ha sigut la durada de cada un dels períodes:

Taula 3: Durada de cada una de les fases i períodes dels dos experiments realitzats

Experiment primer		
Fase de selecció	Període 1	7 dies
	Període 2	7 dies
	Període 3	28 dies
Fase de consorci	Període 4	8 dies
Experiment segon		
Fase de selecció	Període 1	10 dies
	Període 2	2 dies
	Període 3	3 dies
Fase de consorci	Període 4	24 dies

Per al període 4 del consorci s'han pres 4 L de llots del reactor amb PAO i s'han afegit al reactor dels llots de digestió anaeròbia. Els llots s'han pres durant la fase d'extracció, un cop feta la sedimentació per tal d'agafar els llots més concentrats. El consorci ha estat alimentat amb metanol únicament com a font de carboni. S'han mantingut les condicions del reactor amb llots de digestió anaeròbia d'entrada de medi, es a dir, amb els mateixos compostos i concentracions, i una entrada de 5 litres durant els primers 5 minuts de cada cicle.

4.1.2. Lectura de dades del seguiment d'un cicle

Per conèixer els paràmetres dels reactors s'ha fet el seguiments d'alguns cicles. Algunes dades com el pH i l'OD s'han pogut monitoritzar en mitjançant el

PLC, però per conèixer les concentracions d'altres paràmetres com el P-PO₄, el metanol i els AGV, ha calgut fer anàlisis off-line. La recollida de mostres per aquests anàlisis s'ha fet de manera periòdica durant alguns cicles, és a dir que per cada un dels cicles escollits per analitzar, se n'ha pres una o dues mostres cada hora (amb un total de 9 a 11, depenent del grau de detall desitjat), per tal de conèixer les variacions de cada un dels paràmetres al llarg de les 8 hores que dura. S'han seguit en especial aquells cicles que s'han efectuat després de realitzar canvis en els paràmetres del reactor (canvis en els temps de duració de fases anaeròbia/aeròbia i després de bioaugmentar).

La figura 6 mostra el comportament teòric que hauria de tenir del consorci de PAO i microorganismes acetògens i acidògens. En aquest, s'hauria d'observar durant la primera fase anaeròbia de 5 hores (300 minuts), una disminució de la concentració de metanol mentre es produeix un alliberament de P-PO₄ al medi per l'activitat típica dels microorganismes PAO en aquestes condicions. Això ens permetria afirmar que es troben en el medi organismes consumidors de metanol i que hi hauria producció d'AGV ja que els PAO estarien alliberant PO₄³⁻ en el medi per tal de crear els seus polímers de reserva (PHA). S'hauria d'observar també una alliberació de fòsfor és molt elevada en els primers minuts del cicle, i una progressiva estabilització a mesura que es consumeix tot el metanol.

A partir de les 5 hores, començaria la fase aeròbia. Les condicions oxidants farien que els PAO comencessin la fase de captació del fòsfor per a la síntesi de noves molècules de polifosfat i glicogen, i és per això que s'hauria de veure una baixada dràstica en la concentració d'aquest, en un període molt curt. Si la quantitat de P-PO₄³⁻ captat fora superior que la quantitat de P-PO₄³⁻ alliberada, s'obtindria una eliminació neta de fòsfor i per tant s'assoliria l'objectiu del consorci.

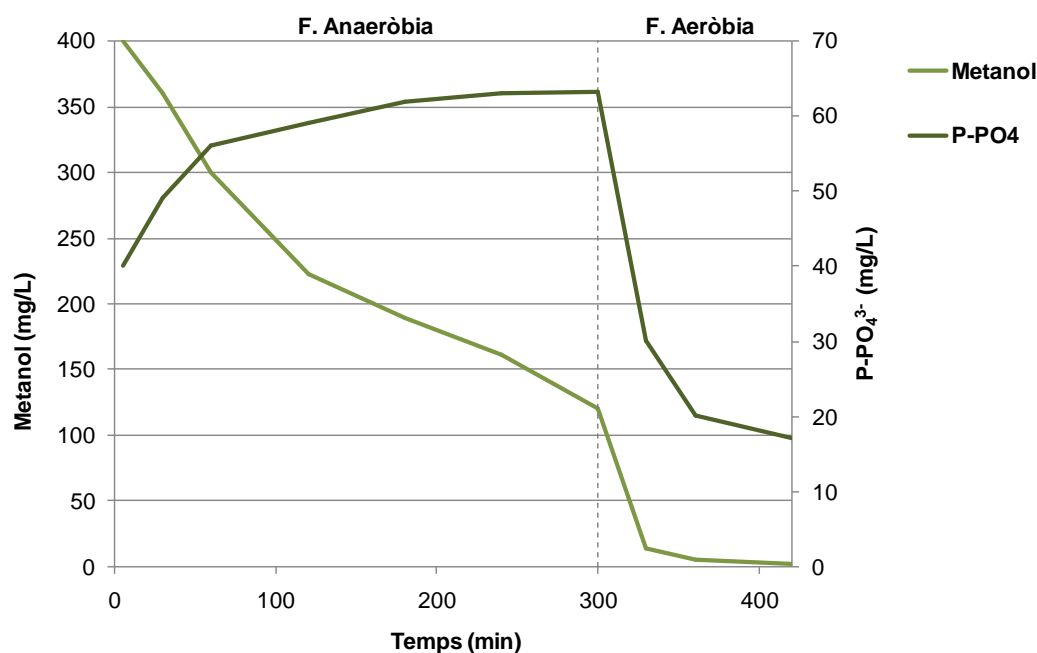


Figura 6: Variacions de les concentracions de metanol i fòsfor al llarg d'un cicle.

4.2 Experiment primer

En el primer intent de creació del consorci s'han dedicat 42 dies per a la fase de selecció de la biomassa de digestió anaeròbia.

En el període 1 el cicle ha estat totalment anaerobi per tal d'aclimatar la biomassa procedent de la digestió anaeròbia a les noves condicions del reactor. Després de set dies, al període 2, se li ha afegit mitja hora d'aire al final del cicle, ja que els microorganismes metanògens no són capaços de sobreviure en condicions aeròbies

Taula 4: Duració dels períodes de l'experiment primer

mentre que els acidògens i acetògens toleren més aquestes condicions. Set dies més tard s'ha programat el cicle definitiu de 5 hores de fase anaeròbia i 2 d'aeròbia. Aquesta configuració ha permès eliminar del sistema als microorganismes metanògens i

	t.anaerobi	t.aerobi
Període 1	7 h	0 h
Període 2	6,5 h	0,5 h
Període 3	5 h	2 h
Període 4 (Consorti)	5 h	2 h

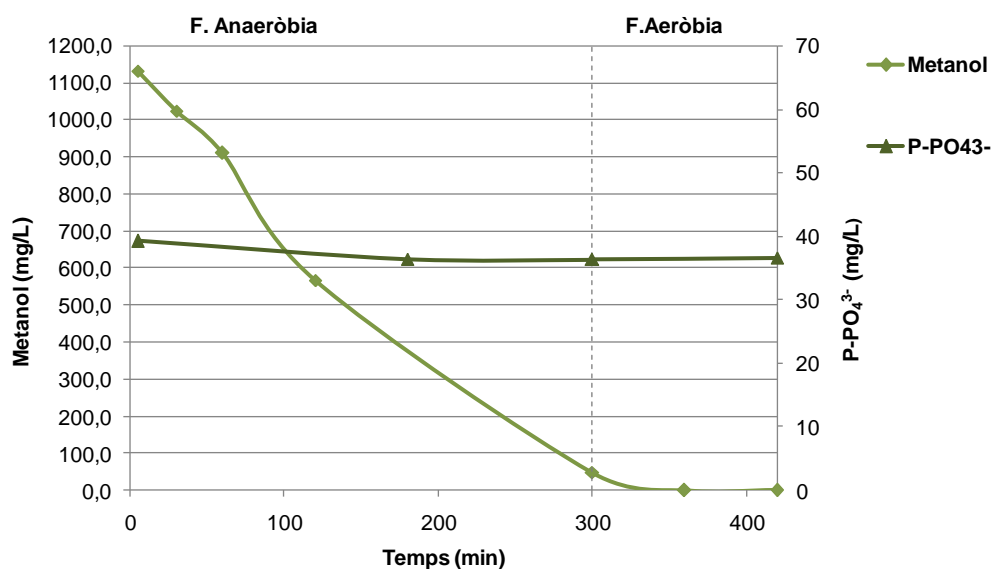
aclimatar als acidògens i acetògens en una configuració del sistema que

posteriorment permetrà eliminar el fòsfor un cop s'hagin bioaugmentat els PAO. Per tal de fer el seguiment dels cicles durant aquests períodes d'aclimatació i selecció de la biomassa s'han extret mostres de metanol i AGV.

A mesura que s'aclimata la biomassa, s'hauria de veure un augment en el consum de metanol durant els primers cicles, ja que la biomassa que es selecciona s'adapta a aquesta font de carboni i finalment una estabilització, ja que l'entrada de metanol sempre és la mateixa i es manté el sistema amb una concentració constant de biomassa gràcies a les purgues periòdiques.

Les quantitats d'AGV en canvi haurien d'augmentar al llarg dels tres primers períodes, de tal manera que s'haurien de detectar concentracions més altes de AGV a mesura que augmenta el temps la fase aeròbia dels cicles, ja que l'objectiu d'aquesta és la eliminació dels microorganismes consumidors d'AGV (metanògens) del total de biomassa de digestió anaeròbia.

En l'estudi de les dades, podem observar que en els seguiments dels períodes 1, 2 i 3 (amb biomassa de digestió anaeròbia sense PAO), hi ha hagut un consum del metanol normal, però no s'ha vist una formació d'AGV en cap cas. També s'han mesurat els nivells de P-PO_4^{3-} per comparar posteriorment amb el sistema amb eliminació de fòsfor, i s'ha vist que les concentracions de fòsfor captat i alliberat són molt baixes al llarg de tot el cicle, indicant que no hi ha microorganismes PAO al sistema abans de la bioaugmentació del SBR A, tal i com es pot veure en la figura 7



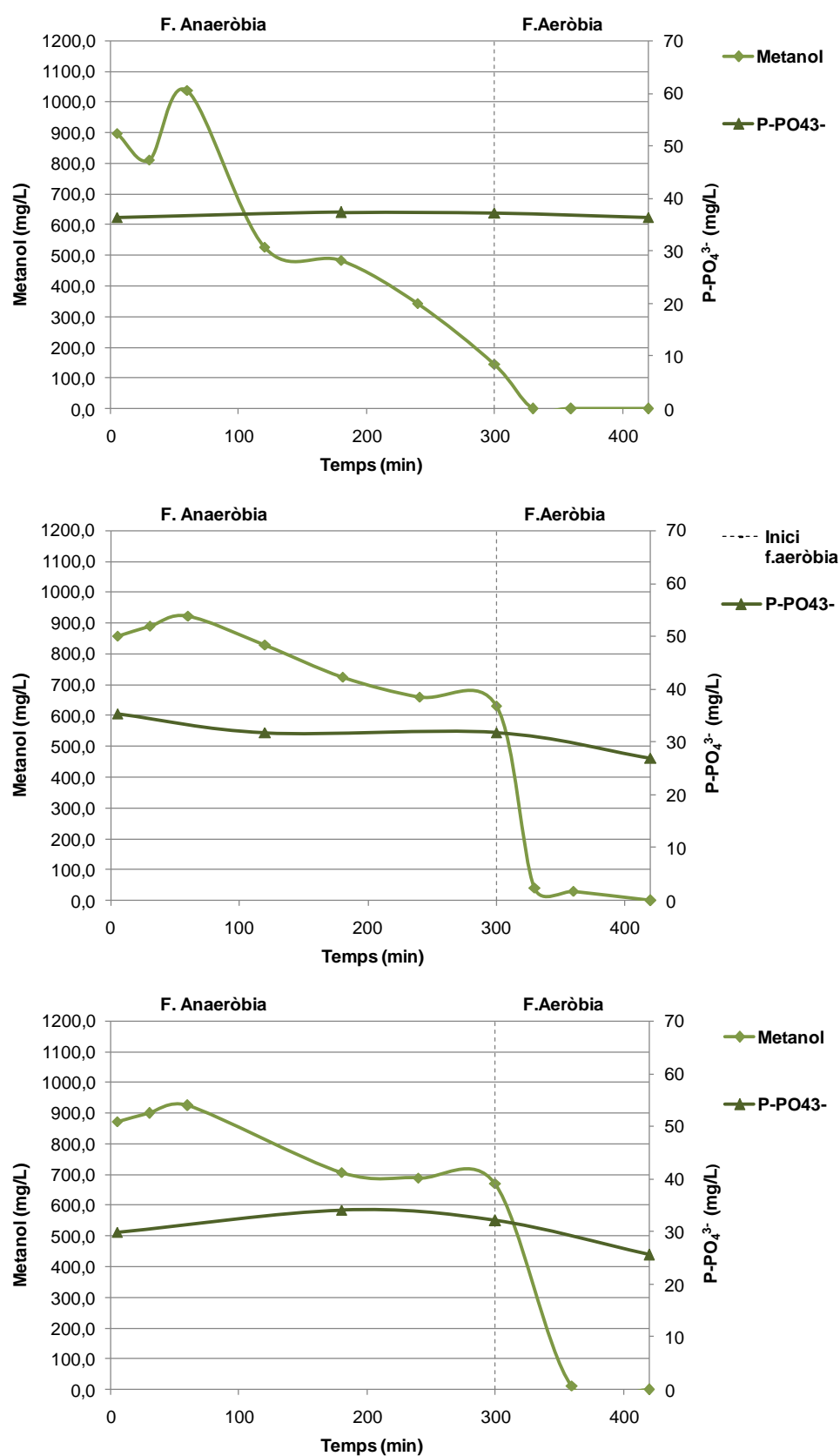


Figura 7: Concentracions de metanol i fòsfor en els cicles seguits els dies 14è, 19è, 33è i 35è respectivament, després de la posada en marxa de l'experiment primer.

Això ens indica que els organismes fermentadors estan treballant com hauria d'esperar-se, degradant la font de carboni (metanol), però el fet de que no es detectin AGV pot indicar que segueixen havent en el sistema organismes que els consumeixen, com podrien ser els metanògens, impossibilitant així la posterior captació dels AGV formats per part dels PAO.

Es pot observar també, que la velocitat de consum del metanol ha estat molt variable. En els primers cicles, el consum es fa pràcticament tot abans d'iniciar la fase aeròbia però en els últims seguiments (33è i 35è) fets prèviament a la bioaugmentació s'observa el consum majori de metanol, durant a la fase aeròbia. Aquests darrers seguiment podrien indicar una disminució dels organismes anaerobis en el reactor, que s'haurien vist desplaçats per alguna altra espècie consumidora d'aquest metanol en condicions aeròbies.

Tot i així la concentració de metanol final en tots els casos és de $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, i tot i no veure en cap dels seguiments, concentracions d'AGV, s'ha comprovat si es possible formar el consorci amb aquests paràmetres.

Finalitzada la fase de selecció s'ha procedit a bioaugmentar la biomassa PAO al reactor on es troba la biomassa de digestió anaeròbia (SBR A), mantenint les mateixes condicions de treball que en el període 3, és a dir, cicles de treball amb 5 hores inicials de fase anaeròbia i 2 hores finals amb aireació (fase aeròbia). Els resultats però, indiquen que la selecció no ha sigut l'adequada i que els PAO no són capaços d'adaptar-se en les condicions donades.

Tal i com podem veure en la taula, en els seguiments realitzats amb el consorci format es dona una eliminació de fòsfor molt baixa. El primer cicle després de la formació del consorci hi ha una eliminació de $9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, fet que indica un bon funcionament inicial, però dos dies més tard l'eliminació ha disminuït fins a $0,9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fet pel qual deduïm que la biomassa PAO no ha estat capaç de competir per la font de carboni amb algun altre microorganisme procedent de la digestió anaeròbia, possiblement metanògens, que s'ha adaptat a les condicions de la fase de selecció, enlloc de morir com estava previst.

Taula 5: Eliminació de fòsfor en els seguiments dels cicles del primer experiment.

Experiment primer	Fase de selecció						Consorti	
Dia	1er	6è	14è	19è	33è	35è	42è	44è
Eliminació de P (mg·L ⁻¹)	2,1	0,4	2,7	0	8,4	4,3	9	0,9

Al gràfic següent es pot veure com en un cicle amb el consorci PAO-fermentadors, el metanol es consumit de la mateixa manera que ho feia en la fase de selecció, i que el fòsfor segueix essent pràcticament constant quan s'esperava que fora eliminat.

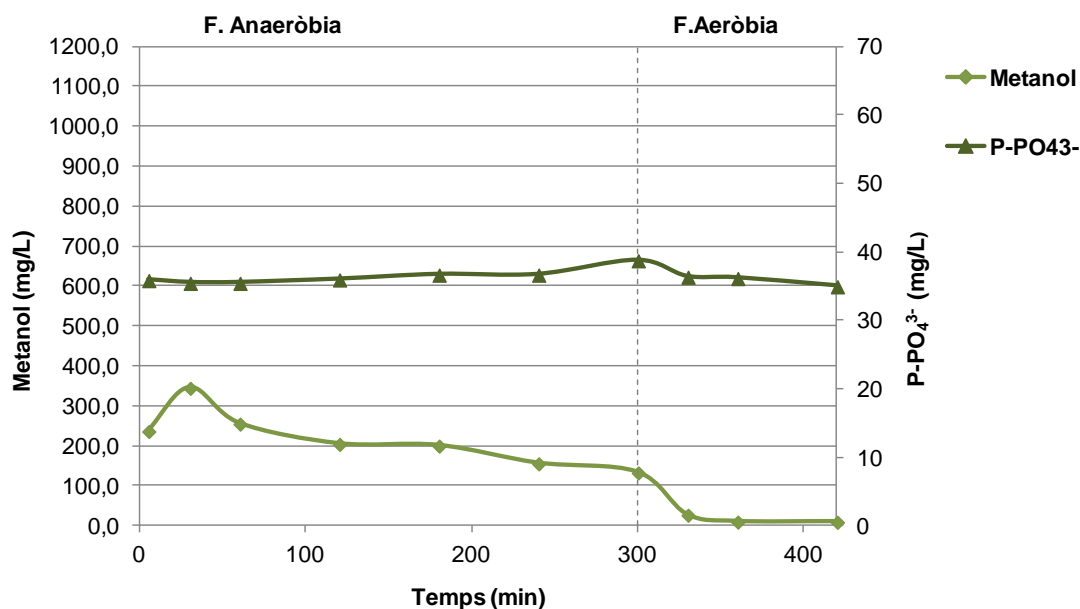


Figura 8: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 44è dia després de la posada en marxa de l'experiment primer, i dos dies posteriors a la formació del consorci PAO-digestió anaeròbia.

La gran varietat d'espècies i la manca de dades de formació d'AGV no ens permet conèixer amb exactitud el motiu pel qual la població de PAO realitza cap activitat ni de captació ni d'alliberació. Tot i així podem suposar varis motius:

- El període de selecció dels organismes fermentadors ha estat massa llarg, Durant aquest temps s'ha vist potenciat el creixement d'alguns microorganismes anaerobis facultatius capaços de consumir AGV. Aquest ha sigut competidor amb els PAO per la font de carboni i a l'estar

els microorganismes de digestió anaeròbia més adaptats a les condicions del medi que els PAO, aquests darrers no poden consumir la suficient quantitat de font de carboni per realitzar la seva activitat EBPR.

- b) La excessiva concentració de metanol en el reactor pot causar inhibició i/o toxicitat en els organismes PAO.
- c) Els fangs de l'SBR B contenen una fracció elevada de GAO i aquests han desplaçat els PAO un cop s'ha bioaugmentat
- d) S'han seleccionat microorganismes consumidors de metanol tant anaerobis com aerobis, que no formen AGV com a subproducte.

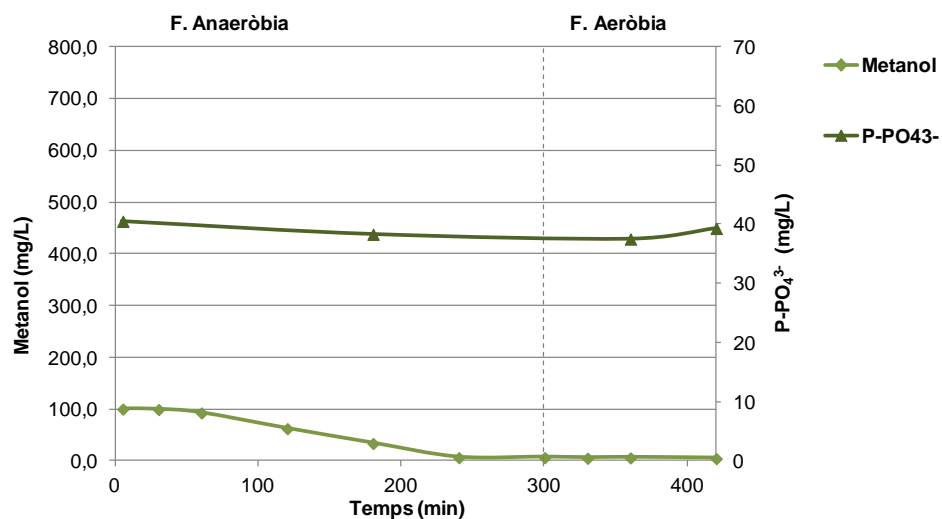
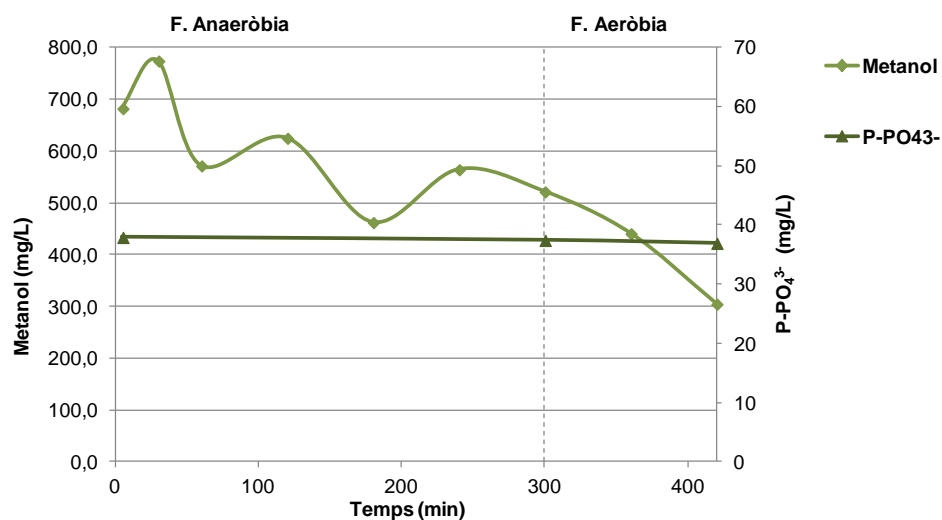
4.3. Experiment segon

Prenent les dades de l'experiment anterior, el segon experiment s'ha plantejat per fer funcionar de manera molt similar al primer, canviant però la durada de la fase de selecció de la biomassa i la quantitat de metanol

Així doncs, s'han fet també tres períodes previs per procurar la supervivència únicament dels organismes fermentadors mitjançant l'addició d'aire, però aquest cop en durant menys dies. El primer període de la fase de selecció ha estat totalment anaerobi (per l'aclimatació de la biomassa al reactor) i ha tingut una durada de 10 dies, i pel que fa al segon i al tercer període, s'han dut a terme amb només amb 2 i 3 dies respectivament. L'altre canvi que s'ha realitzat, i com es pot també observar també en el gràfics a continuació, ha sigut la disminució de metanol a l'entrada per tal d'obtenir una concentració més baixa en el reactor per evitar possibles problemes d'inhibició o toxicitat del mateix.

La figura 9 mostra les dades preses en els tres períodes diferents, la primera en un cicle totalment anaerobi, la segona amb mitja hora d'aïració final i la

última amb dues hores d'aireació final. Es pot observar com el P-PO_4^{3-} no presenta variacions significatives de concentració, pel qual es dedueix que no es troben PAO en la biomassa. Pel que fa el metanol, ha estat necessari fer una segona reducció de la concentració d'entrada per tal de que sigui consumit al final del cicle i no s'acumuli en el reactor, tal i com es pot veure en la segona i tercera gràfica. A diferència de l'experiment anterior, la quantitat de metanol consumida és inferior, ja que en el primer es partia d'una concentració de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ i en el segon de $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Tot i així considerem que s'ha fet una millor selecció de la biomassa ja que aquest cop el consum es dona tot durant la fase anaeròbia i es descarta la possibilitat de tenir en el reactor microorganismes aerobis consumidors de metanol, que per tant no són ni els acidògens ni els acetògens que ens interessa.



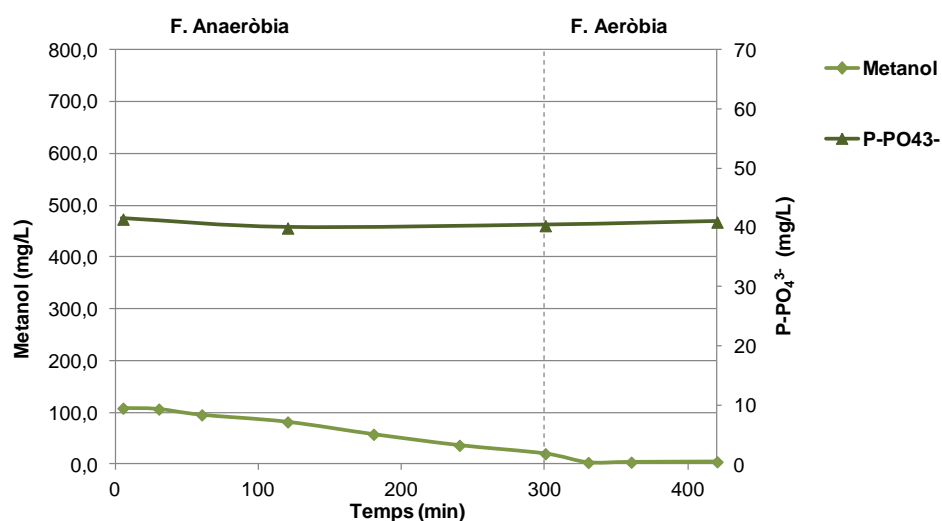


Figura 9: Concentracions de metanol i fòsfor en els cicles seguits els dies 4t (període 1), 9è(període 2), 11è(període 3) respectivament, després de la posada en marxa de l'experiment segon.

Passada la fase de selecció, s'ha bioaugmentat l'SBR A amb la biomassa PAO procedent del SBR B per tal de formar el consorci. Les condicions d'operació del consorci són les mateixes que en el període 3 de la fase de selecció; cicles amb 5hores de fase anaeròbia, dues en aeròbia i una final per sedimentació i extracció. El mateix dia de la bioaugmentació s'ha fet un seguiment del cicle on s'han obtingut els valors següents:

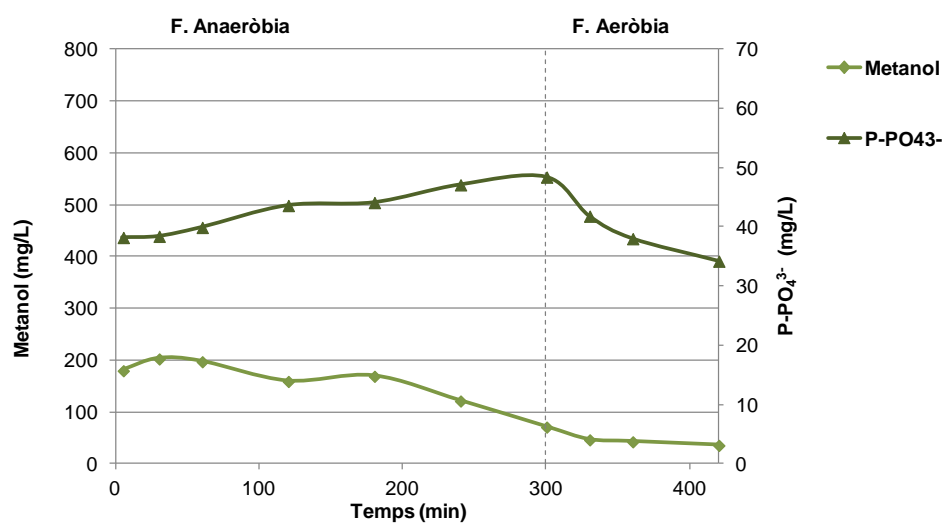


Figura 10: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 14è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i el primer fet després de la bioaugmentació de PAO en l'SBR A.

Com es pot observar en el la figura 10, el consum de metanol es duu a terme especialment durant la fase anaeròbia. Durant aquesta mateixa fase la concentració de P-PO_4^{3-} en el medi augmenta, fent-se més estable a mesura que la concentració de metanol arriba a concentracions més baixes.

En comparar les dades els primers seguiments fets en el moment de formació dels dos consorcis el de l'experiment primer i el de l'experiment segon, s'observa que tant en l'un com en l'altre, s'obtenen uns valors d'alliberació i captació de fòsfor similars, essent en de 9 i 4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivament (velocitats de consum de metanol; 0,71 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i 0,34 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ respectivament) i són uns valors que en els dos casos indicarien un bon funcionament del consorci, però com ja s'ha vist en el cas anterior, el primer cicle no és significatiu, i és necessari comparar amb cicles posteriors per saber si la biomassa PAO s'adapta correctament al sistema o no. S'han fet per tant, altres seguiments de l'SBR A per provar la continuïtat del consorci:

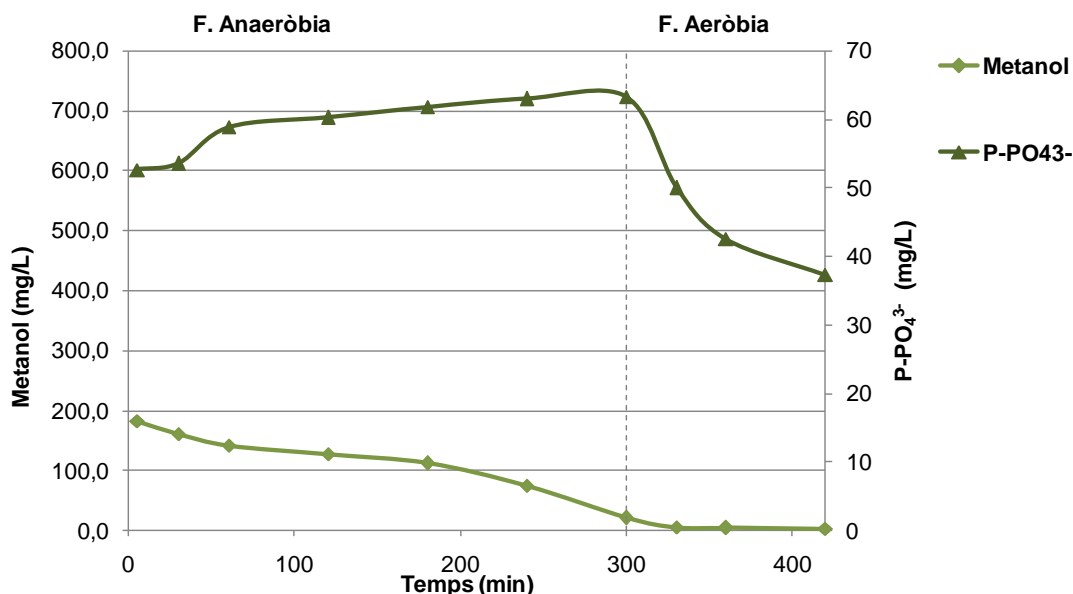


Figura 11: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 21è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i una setmana més tard després d'haver creat el consorci.

La figura 11, correspon a un cicle fet set dies després de la bioaugmentació dels PAO i tal i com es pot comprovar, el consum de metanol té una velocitat

similar a l'anterior $0.43 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ i la eliminació total de fòsfor ha estat de $15.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, donant així un augment de la quantitat de fòsfor eliminada respecte el primer cicle fet en el moment posterior a la bioaugmentació.

Es suposa doncs, que durant aquest període els PAO s'han adaptat favorablement dins del consorci i que els metanògens han sigut eliminats al llarg d'aquest temps, augmentant així la formació d'AGV i incrementant així l'eliminació de fòsfor.

Finalment, s'ha realitzat l'anàlisi d'un últim cicle, 24 dies més tard

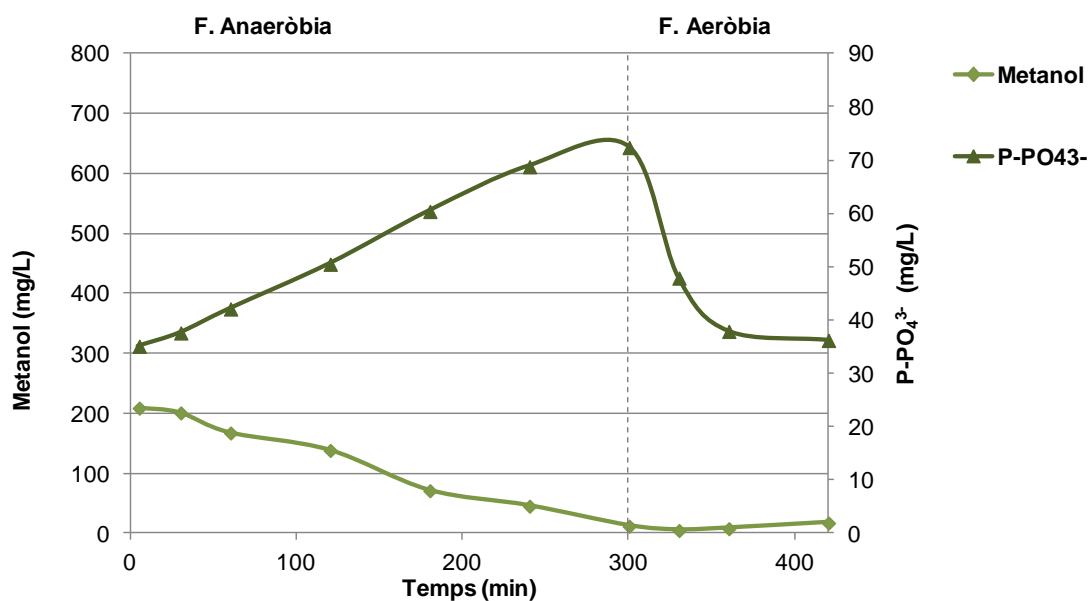


Figura 12: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 40è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i 26 dies mes tard de la creació del consorci.

En aquest darrer seguiment del consorci, s'observa d'una banda un consum normal del metanol, fet majoritàriament durant la fase anaeròbia, i amb una velocitat de $0,46 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, i s'observa d'altra banda un canvi en el comportament dels PAO. Si bé l'alliberació de P-PO₄³⁻ arriba a valors que no s'han obtingut en cap altre dels cicles analitzats ($72,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), la captació no és suficientment gran com per obtenir eliminació neta. Malgrat això, no es pot concloure res ja que seria necessari fer més seguiments per tal de saber si es tracta del mal funcionament EBPR d'un cicle puntual, falta de purga en el sistema o si deixa de funcionar el consorci per proliferació d'algun microorganisme competidor.

El conjunt de valors d'eliminació de $P-PO_4^{3-}$ obtinguts en el segon experiment han estat els següents:

Taula 6: Eliminació de fòsfor en els seguiments dels cicles del segon experiment.

Experiment segon	Fase de selecció			Consorti		
Dia	4rt	9è	11è	14è	21è	40è
Eliminació de P ($mg \cdot L^{-1}$)	1	1,2	1,3	4	15,4	-1

Pel que fa a la variació de la concentració de metanol a l'entrada, es pot afirmar que per una banda no ha permès que l'alliberació i la captació hagin estat màximes ja que no han tingut suficient font de carboni disponibles pels PAO, tot i que per l'altra banda, ha permès l'adaptació d'aquests ja que no ha inhibit la seva activitat ni el seu creixement. Les condicions de treball que s'han utilitzat en aquest segon intent de formació del consorci han estat més favorables i han permès el funcionament durant un període més llarg de temps.

Estimació del rendiment

Per tal de conèixer el rendiment de l'experiment, pot estimar-se estequiomètricament el metanol aprofitat pels PAO i pels altres microorganismes que puguin "habitar" en el reactor.

Essent la ratio màxima $P/C_{Metanol}$ és de 0,75 (Tayà *et al. submitted*), (assumint que per cada 4 mols de $C_{Metanol}$ es formen 3 mols àcid d'acètic, i que per cada 2 mols de $C_{Acètic}$ s'allibera un mol de fòsfor, segons els models teòrics, Oehmen *et al.*, (2009), s'obté que per cada $200 mg \cdot L^{-1}$ de metanol que entren al reactor, s'haurien d'alliberar $145 mg \cdot L^{-1}$ de fòsfor. Aquests valors ens demostren que el rendiment dels processos és força baix ja que en cap experiment s'han sobrepassat els $40 mg \cdot L^{-1}$ fòsfor alliberat. Les causes d'aquest baix rendiment poden ser molt diverses:

- Dedicació de part del carboni d'entrada al creixement (caldrà tenir en compte el rendiment biomassa substrat en els ratios)

- Existència de microorganismes que consumeixen metanol però no formen àcid acètic
- Existència de microorganismes consumidors d'àcid acètic, que no tenen res a veure amb el cicle del P

Així doncs, un cicle com el l'últim que s'ha seguit, on l'alliberació de fòsfor és de $33,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, els microorganismes PAO han captat $65,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'àcid acètic i els acetògens per tal d'obtenir-los, han captat $46,4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de metanol, que representa només un 23% del metanol total d'entrada. Tot i aquest rendiment tan baix, s'ha aconseguit l'objectiu que era obtenir EBPR amb metanol com a única font de carboni. L'optimització del procés per maximitzar el ratio P/C és objectiu d'un treball futur.

4.3.1. Anàlisi de Polihidroxialcanoats

Per tal de verificar que els PAO eliminen el fòsfor de la manera que es planteja, s'han fet també anàlisi dels Polihidroxialcanoats (PHA). Amb aquest es calcula la quantitat d'àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric que s'acumula dins les cèl·lules al llarg del cicle, a mesura que consumeixen els AGV. Aquests polímers només s'acumulen durant la fase anaeròbia i es consumeixen quan els bacteris es troben en presència d'acceptors d'electrons (condicions aeròbies o anòxiques). Al ser aquest anàlisi tant costós només s'ha dut a terme en un únic cicle del consorci. En aquest cicle s'hauria de veure una relació lineal entre el metanol consumit i el PHA acumulat, i una disminució de la concentració de PHA a partir del moment que comença la fase aeròbia ja que es quan es consumeix.

En la figura 13 s'observa que les concentracions de PHA dins les cèl·lules només augmenten durant les primeres dues hores del cicle. En les següents tres mostres es dona una baixada de la concentració de PHA a les cèl·lules, enlloc de donar-se l'increment esperat ja que són mostres de la fase anaeròbia. És molt difícil explicar aquesta baixada ja que no correspon amb les dades

d'alliberació i captació de P-PO_4^{3-} analitzades en l'apartat anterior. En principi l'acumulació de PHA hauria d'haver estat gradual fins als 300 minuts que dura la fase anaeròbia. Un error en la presa de mostres és possible que hagi alterat els resultats d'aquesta prova. Finalment a partir del minut 330 que es quan entra en marxa el sistema d'aïreació, es dona una baixada considerable de les concentracions de PHA, que demostren que els PAO estan captant el fòsfor mentre degraden el PHA acumulat en la fase anterior. El consum de PHA cel·lular durant la fase aeròbia és dona per restablir els nivells de P-PO_4^{3-} en l'interior cel·lular alhora que també es restableixen els nivells de glicogen en el seu interior.

Pel que fa al percentatge de cada un dels compostos mesurats, trobem absència de àcid hidroxivalèric en totes les mostres. En quan a l'àcid hidroxibutíric resulta majoritàriament del metabolisme cel·lular a partir de l'àcid acètic, en canvi, l'àcid 2-metil-hidroxivalèric s'acumula majoritàriament quan el substrat és l'àcid propiònic. Es pot deduir així l'activitat metabòlica dels microorganismes de digestió anaeròbia i afirmar que predominen els acetògens.

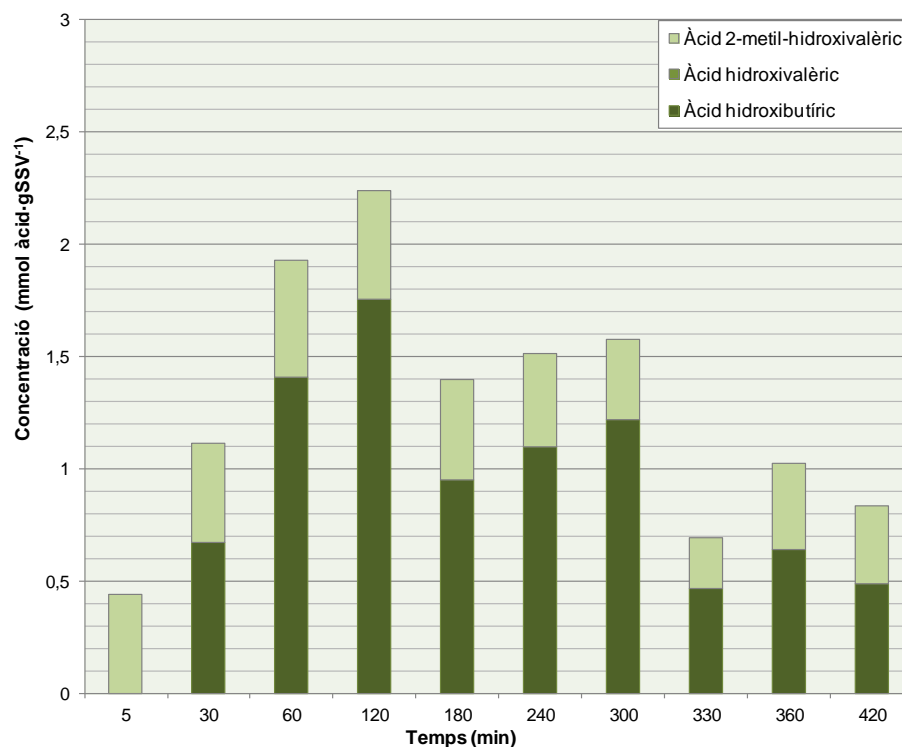


Figura 13: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle seguit 26 dies després de la creació del consorci.

4.3.2. Hibridació in-situ fluorescent(FISH)

La tècnica de hibridació *in situ* fluorescent s'utilitza per diferenciar seqüències d'ADN, gens, o en aquest cas espècies bacterianes de les quals es coneix part de la seva seqüència gènica. La tècnica consisteix en preparar seqüències d'ADN de cadena simple, que són complementàries a les seqüències d'ADN de la bactèria o a determinar. Aquests fragment d'ADN extern,

anomenat sonda, es marca amb alguna molècula fluorescent com biotina o

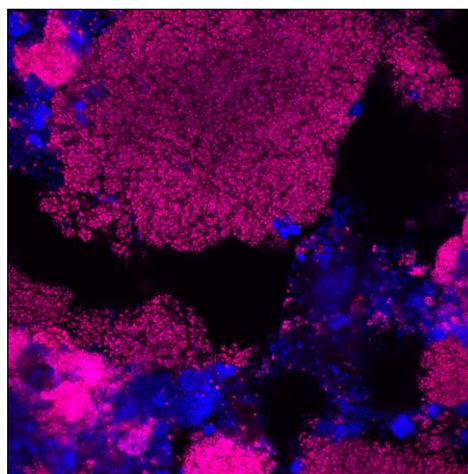


Figura 14: Foto dels microorganismes PAO (rosa) i GAO (blau) feta amb el microscopi confocal a una mostra dels llots de l'SBR A

fluoresceïna. Aquesta sonda en entrar en contacte amb la mostra, "s'adhereix" amb el fragment d'ADN complementari (en cas de ser-hi). Mitjançant un microscopi comfocal, la fluorescència permet identificar en aquest cas les cèl·lules marcades per la sonda.

En l'experiment que s'ha realitzat s'han utilitzat sondes amb fluorescència blava per hibridar el conjunt d'eubactèries i sondes amb fluorescència vermell per hibridar únicament els organismes PAO.

Taula 7: Quantificació de les concentracions de les PAO i GAO en els SBR A i B, sobre el total de espècies existents.

	SBR A (%)	SBR B (%)
PAOMIX	61,9 ± 0,6	72,8 ± 2,6
GAOMIX	N,D	0,6 ± 0,2
DF1MIX	1,8 ± 0,5	2,6 ± 0,6
DF2MIX	3,8 ± 0,7	7,9 ± 1,6

En la taula 7 es pot observar la proporció dels microorganismes PAO (PAOMIX) i els seus competidors directes els GAO (GAOMIX, DF1MIX, DF2MIX) tant en el reactor on s'ha format el consorci (SBR A) com en el reactor

d'on s'han extret els llots per bioaugmentar el consorci (SBR B) respecte el total de bactèries presents.

Totes dues mostres es van analitzar després dels períodes previs d'adaptació de cadascun dels reactors. Així, per l'SBR B, aquest anàlisi es va fer un dia abans d'extreure els llots per bioaugmentar l'SBR A i formar el consorci PAO-fermentadors, mentre que l'extracció de la mostra per la realització de l'anàlisi per l'SBR A es va fer passats 15 dies després de la bioaugmentació, un cop el consorci ja estava aclimatant i funcionant a ple rendiment.

Amb els resultats de la taula es pot veure que en l'SBR B, en el moment previ a la bioaugmentació hi havia un 72,8% de PAO i que només un 10% del total de la biomassa existent en el SBR B eren microorganismes GAO (majoritàriament DF2). Això indica un enriquiment de PAO d'aquest reactor força elevat.

De la mateixa manera és pot veure que en el consorci format pels PAO-fermentadors hi ha un alt percentatge de microorganismes PAO encara que ha disminuït respecte la biomassa del SBR B. Aquest resultat sembla lògic ja que en bioaugmentar els PAO en aquest reactor on ja hi havia biomassa procedent de la digestió anaeròbia aquest percentatge es veu lleugerament disminuït. De la mateixa manera també disminueix el percentatge dels GAO.

4.4. Experiments en discontinu

En l'últim període de cada un dels experiments s'han dut a terme els experiments en discontinu. S'ha utilitzat aquesta tècnica per provar diferents fonts de carboni amb la biomassa PAO i el consorci PAO-fermentadors.

L'objectiu d'aquests, és comprovar si el consorci és capaç d'adaptar-se a diferents fonts de carboni, és a dir, si els organismes acetògens i acidògens seleccionats amb metanol com a única font de carboni són capaços de prendre altres fonts de carboni més complexes que el metanol i realitzar el mateix procés de degradació fins a proporcionar AGV de cadena curta que permetin l'activitat EBPR.

Per tal de comparar, en primer lloc, s'han realitzat els experiments en discontinu amb biomassa únicament PAO, per comprovar que aquests sols no són capaços de utilitzar com a font de carboni fonts complexes i que només eliminen fòsfor si tenen propiònic o acètic com a font de carboni.

En segon lloc s'han realitzat els mateixos experiments en discontinu però amb biomassa extreta del consorci per analitzar com funcionen amb cada una de les fonts de carboni que se'ls proporciona.

Així doncs s'han realitzat 15 experiments en discontinu diferents. En aquests experiments s'han simulat les mateixes fases que tenen els SBR (anaerobi-aerobi) i s'han alimentat amb les mateixes aigües que s'operen en el reactor.

Les 7 primeres s'han fet amb la biomassa PAO alimentada amb àcid propiònic com a única font de carboni. Els polsos que s'introdueixen per afegir les diferents fonts de carboni s'han calculat per obtenir les mateixes concentracions de DQO indiferentment del compost utilitzat. Aquesta concentració ha estat de 600 mg DQO/L. Les fonts de carboni escollides per aquests experiments són: metanol, etanol, glucosa, sacarosa, glicerol i llet. El setè experiment s'ha fet sense font de carboni. Els 8 experiments en discontinu posteriors, s'han fet amb la biomassa provinent del consorci i s'han utilitzat les mateixes sis fonts de carboni a més a més d'un setè amb àcid propiònic. El vuitè experiment en discontinu s'ha fet també sense font de carboni.

4.4.1. Experiments amb discontinu amb biomassa PAO-propioníc

En els experiment en discontinu en els que només s'ha utilitzat biomassa PAO (taula 8), es pot veure que les concentracions de $P-PO_4^{3-}$ no romanen constants (hi ha una petita alliberació i captació de P) però tot i així en casi cap dels casos s'hi dona una eliminació neta.

En la única que es dona una petita eliminació és amb la llet ($3,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Possiblement degut a que es una mescla de varis compostos entre els quals es

troba una petita fracció d'àcids grassos de cadena curta que serien utilitzats pels PAO com a font de carboni.

Taula 8: Concentracions de fòsfor alliberat, captat i eliminat pels PAO en els experiments en discontinu abans del consorci

	Metanol	Etanol	Sacarosa	Glucosa	Glicerol	Llet	Sense font
P alliberat (mg·L ⁻¹)	16.2	11	19.6	36.2	17.3	25.4	11.6
P captat (mg·L ⁻¹)	6.7	9.5	16	14.5	10	28.7	4.1
P eliminat (mg·L ⁻¹)	-9.5	-1.5	-3.6	-21.7	-7.3	3.3	-7.5

Cal destacar també que exceptuant l'etanol, a tots els compostos hi ha una alliberació de fòsfor superior en comparació amb el que no té pols font de carboni, per tant podem deduir que d'alguna manera hi ha algun consum per part dels PAO de fonts més complexes que els AGV, tot i que no els permetin posteriorment captar més fòsfor del que han eliminat.

Per altra banda s'observa que l'etanol es el que causa una alliberació i captació de fòsfor més baixes, segurament degut a la seva toxicitat.

4.4.2. Experiments en discontinu amb biomassa del consorci

En els experiments en discontinu que s'han fet amb les dues biomasses (acidògens, acetògens i PAO), els rendiments d'eliminació han millorat. Fixant-nos amb la taula següent, es pot veure en primer lloc el metanol que és la font de carboni amb la que s'aconsegueix, amb molta diferència, més eliminació de fòsfor. Aquest comportament era d'esperar ja que la biomassa fermentadora està adaptada al consum de metanol, ja que és l'única font de carboni en els cicles en l'SBR. Tot i que la quantitat alliberada sigui relativament baixa, el fòsfor captat és tant que l'eliminació neta és de 18 mg·L⁻¹.

Tot i així la gran diversitat de microorganismes que formen part de la biomassa fermentadora fa que altres compostos també puguin ser degradats. Trobem que la llet i el glicerol també permeten eliminació neta de fòsfor. Comparant amb l'experiment fet sense font de carboni, la glucosa i la sacarosa donen resultats molt similars, amb una eliminació neta de fòsfor negativa. La poca

adaptació dels organismes de digestió anaeròbia a aquest tipus de molècules dificulta la seva captació. Tot i així no pot afirmar-se que no seria possible el consorci amb aquest tipus de font de carboni ja que faria falta comprovar-ho amb un període d'adaptació previ.

Pel que fa l'experiment amb etanol, trobem alliberació de fòsfor en les dues fases, tan anaeròbiament com aeròbiament, D'aquest comportament es dedueix que la toxicitat causada provoca la lisis cel·lular i augmenten els nivells de fòsfor producte de la descomposició de les cèl·lules.

Per últim, en el cas del propiònic es dona també un comportament molt singular en el que hi ha una alliberació del fòsfor, però no és capta casi res en comparació amb els resultats extrets durant un cicle d'operació normal en el SBR B.

Taula 9: Concentracions de fòsfor alliberat, captat i eliminat pels PAO en els experiments en discontinu després del consorci

	Metanol	Etanol	Sacarosa	Glucosa	Glicerol	Llet	Sense font	Propiònic
P alliberat (mg·L ⁻¹)	4.6	6.5	1.7	1.9	3.3	7.5	0.9	23.1
P captat (mg·L ⁻¹)	23.2	-15.7	1.6	1.7	6.6	14.4	3.5	6.7
P eliminat (mg·L ⁻¹)	18.6	-22.2	-0.1	-0.2	3.3	6.9	2.6	-16.4

4.4.3. PHA experiments en discontinu

En les gràfiques a continuació es mostren els valors de PHA acumulats dins els microorganismes PAO en cada un dels experiments en discontinu amb les diferents fonts de carboni. Les mostres han estat preses al final de la fase anaeròbia que és el moment en que teòricament la cèl·lula ha captat la màxima quantitat de àcids grassos volàtils, i els ha transformat en PHA com a sistema de reserva energètic. En figura 15 es poden observar els valors de PHA que ha acumulat la biomassa PAO-fermentadors. Aquesta biomassa ha acumulat poc PHA ja que no es troben àcids grassos a l'aigua, més que aquells que s'han afegit juntament amb els dos litres de fangs quan s'ha afegit la biomassa. El

PHA mesurat esta format únicament per àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric, que són els polímers que es formes majoritàriament amb el consum de l'àcid propiònic. Aquest resultat era d'esperar ja que aquesta forma d'AGV, és l'única que en principi es podia trobar en el medi.

Es troba una gran acumulació de PHA a la biomassa que ha treballat amb llet com a font de carboni. Com s'ha observat també en l'experiment anterior, aquesta font de carboni és la que millor ha funcionat, i l'alta concentració de PHA acumulat demostra que hi ha hagut activitat EBPR.

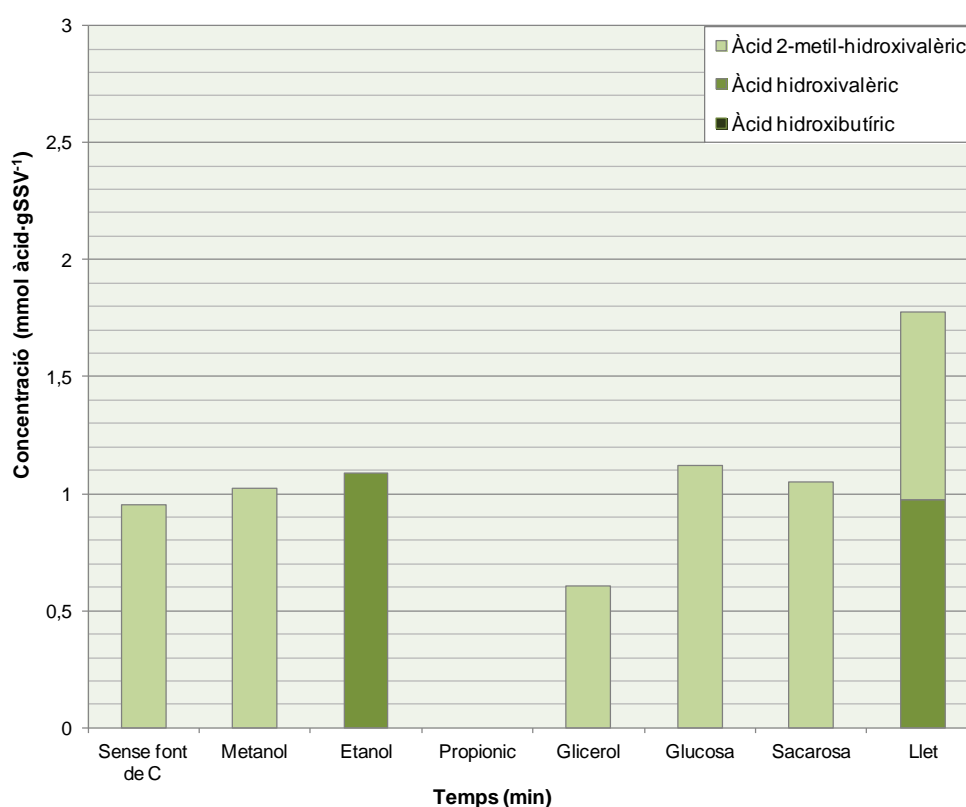


Figura 15: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle en discontinu fet amb biomassa PAO-propiónic

Tot i així aquest anàlisi ens aporta poca informació ja que tal i com s'ha vist en els anàlisis de PHA del consorci comentats anteriorment, és necessari fer el seguiment de tot el cicle per obtenir resultats significatius.

Trobem doncs relació entre el PHA acumulat i el $P-PO_4^{3-}$ alliberat només en l'experiment de la llet. En els experiments de glucosa i sacarosa on l'alliberació

de $P-PO_4^{3-}$ és força alta, no s'observa generació de PHA, fet que fa pensar que l'alliberació de P que s'ha donat, no ha estat per activitat PAO.

En quant al PHA acumulat en els experiments en discontinu amb la biomassa del consorci, s'ha obtingut una millor relació pel que fa el $P-PO_4^{3-}$ alliberat i el PHA acumulat. En l'experiment que s'ha utilitzat llet com a font de carboni i s'han obtingut $23,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de P alliberat i, l'acumulació de PHA ha estat molt elevada. Tot i així, segueixen mancant dades de PHA dels cicles complets.

Pel que fa la distribució dels àcids en el total del PHA, es pot observar la manca de àcid hidroxibutíric, que només s'ha pogut observar en l'experiment fet amb etanol. Aquest àcid es forma majoritàriament a partir del consum d'àcid acètic.

Aquest fet ens indicaria una baixa formació d'aquest per part dels microorganismes de digestió anaeròbia. Malgrat això, es considera que l'experiment de PHA no és significatiu deguda la falta de dades, i la contrarietat amb les dades de PHA obtingudes en el seguiment del consorci, on es veuen grans quantitats d'àcid hidroxibutíric.

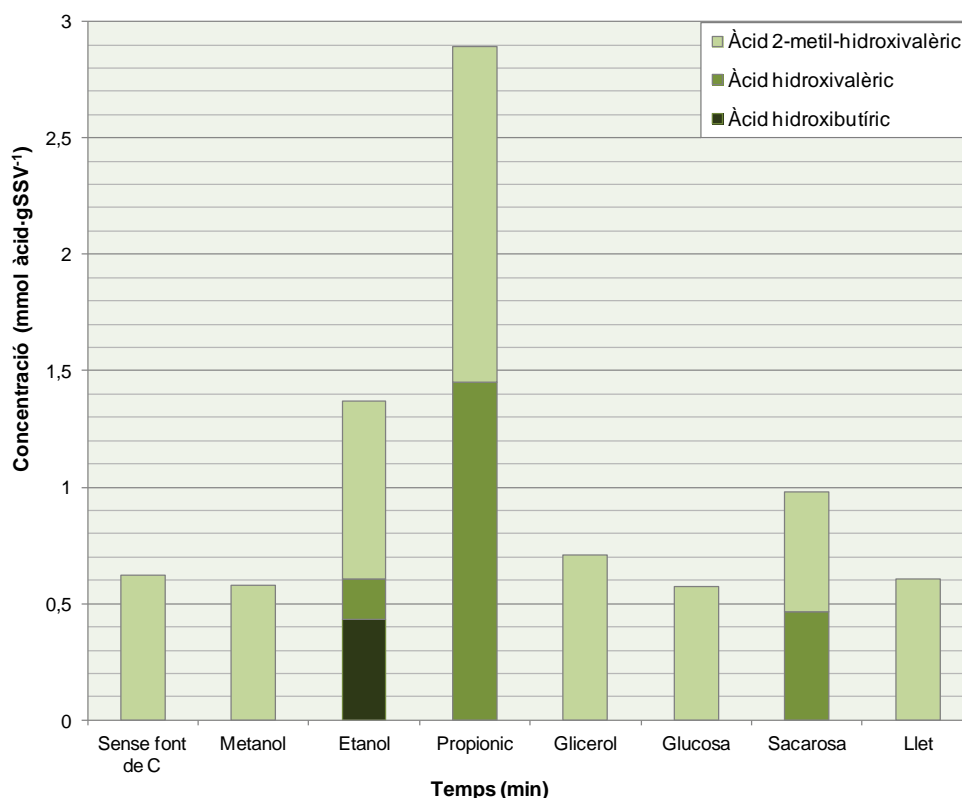


Figura 16: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle en discontinu fet amb biomassa del consorci

5.CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts es pot dir que:

És possible la formació d'un consorci per a l'obtenció de EBPR amb fonts de carboni diferents a les habituals amb microorganismes de digestió anaeròbia i PAO tot i que és necessària més experimentació per trobar les condicions idònies. Tot i així es pot concloure que:

- a) Per la posada en marxa del sistema, és necessari un condicionament de la biomassa de digestió anaeròbia. No es pot bioaugmentar sense aquesta etapa prèvia ja que en els llots de digestió anaeròbia hi ha microorganismes que competeixen amb els PAO per la font de carboni.
- b) La concentració de metanol ha de ser suficient per poder garantir el màxim rendiment EBPR, però un excés pot causar inhibició.
- c) La majoria del PHA acumulat pels PAO, ha estat en forma d'àcid hidroxibutíric, per tant podem afirmar que la major part de font de carboni captada per la biomassa de digestió anaeròbia, es transforma en àcid acètic.
- d) En els experiments en discontinu amb la biomassa del consorci i amb la biomassa PAO alimentada amb propiònic, s'ha utilitzant etanol, propiònic, glicerol, glucosa, sacarosa i llet com a fonts de carboni alternatives, i s'ha donat una millor activitat EBPR quan ha funcionat el consorci, i especialment quan s'ha utilitzat metanol ja que se'ls havia aclimatat a aquestes condicions. Es considera doncs, que el consorci és apte per funcionar amb altres fonts de carboni. Tot i així és necessària l'aclimatació prèvia de la biomassa per poder obtenir un bon rendiment.

6.BIBLIOGRAFIA

AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER KH. (1995); "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation"; *Microbiology reviews*; Volum 59, Pàgines 143-169

APHA (1995); "Standard Methods for the examination of water and wastewater", 19th edition, American Public Health Association, Washington DC, USA. ISBN 9780875532356

ARAGÓN C, (2009); " Optimización del proceso de lodos activos para reducir la generación de fangos residuales" (www.serviciopublicaciones.uca.es)

BARNARD J.L., (1976); "A review of biological phosphorus removal in the activated sludge process"; *Water Research*; Volum 30, Pàgines 769-780.

BOND P.L., HUGENHOLTZ P., KELLER J., BLACKALL L. (1995); "Bacterial community structures of phosphate removing and non phosphate removing activated sludges from sequencing batch reactors"; *Applied and Environmental Microbiology*; Volum 61, Pàgines 1910-1916.

TAYÀ C., GUERRERO J., VANNESTE G., GUISASOLA A., BAEZA J., (2011) "Methanol-driven enhanced biological phosphorus removal with syntrophic consortium". *En revisió*.

DAVELAAR D, DAVIES TR, WIECHERS SG (1978); "The significance of the anaerobic zone for the biological removal of polyphosphate from wastewater"; *Water SA*; Volum 4, Pàgines 54-60

GREENBURG A.E., KLEIN G., KAUFFMAN W.J., (1955); "Effect of phosphorus on the activated sludge process"; *Sewage and Industrial Wastes*, Volum 27, Pàgines 277-282

GÓMEZ, M., (2008); “Estudio de contaminantes orgánicos en el aprovechamiento de lodos de depuradora de aguas residuales urbanas” *Diposit institucional de la universitat d’Alacant* (www.rua.ua.es)

GUERRERO J., TAYÀ C., GUIASOLA A., BAEZA J. (2011); “Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal”, *Water Research, Volum 46, Pàgines 2983-2991*

LEVIN GV, SHAPIRO J (1965); “Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms”; *J. Water Pollut. Contr. Fed.; Volum 37, Num 6, Pàgines 800-821.*

MARAIS GR, LOEWENTHAL RE, SIEBRITZ IP (1983); “Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake. A Review”. *Water Sci Technol; Volum 31, Num 6. Pàgines 1430-1438.*

MARTÍN I., BETANCORT J.R., SALAS J.J., PEÑATE B., PIDRE J.R y SARDÓN N. (2006); “Guía sobre tratamientos de aguas residuales urbanas para pequeños núcleos de población” *Proyecto Icrewll. Edición: Instituto Tecnológico de Canarias (ITC).*

MASSÉ, D.I., DROSTE R.L. (2000); “Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor” *Water Research; Volum 34, Issue 12, Pàgines 3087–3106*

METCALF i EDDY (1995); “Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y reutilización”; 3 ed. *McGraw-Hill, Madrid*. ISBN 9788448116071

MUÑOZ, J.A., ORTÍZ-GAÑAVATE, J., VÁZQUEZ, J. (1987). “Técnica y aplicaciones agrícolas de la biometanización. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación”. ISBN 9788474796162

PETZET S., PEPLINSKI B., CORNEL P., (2012); “On wet chemical phosphorus recovery from sewage sludge ash by acidic or alkaline leaching and an optimized combination of both” *Water research. Acceptat no publicat.*

POTE D.H., DANIEL T.C. (2003); "Analyzing for Dissolved Reactive Phosphorus in Water Samples" *Southern Cooperative Series Bulletin No. # 396* (www.sera17.ext.vt.edu)

SATOH H., MINO T., MATSUO T. (1992); "Uptake of organic substrates and accumulation of polyhydroxialcanoates linked with glycolysis of intracellular carbonhydrates under anaerobic conditions in the biological excess phosphate removal processes"; *WaterSci Technol; Volum 20, Pàgines 1055-1063*.

SATOH. M., RAMEY. W.D., KOCH F. A., OLDMAN W.K., MINO T., MATSUO T. (1996); "Anaerobic substrate uptake by the enhanced biological phosphorus removal activated sludge treating real sewage"; *Wat. Sci. Tech; Volum 34, Pàgines 9-16*.

7. ANNEXES

7.1. Pressupost

El cost total del projecte és de 3563.35 €.

Per a la determinació de les despeses tindrem en compte els següents apartats:

- Materials i equips; 1206.14
- Despesa de personal; 2087.5 €
- Energia; 269.71

7.1.1 Materials i equips

Cost total de materials i equips; 1206,14 €

Material d'oficina; 81 €

Material de laboratori fungible; 408,14 €

Material de laboratori amortitzable: 717 €

Desglossament dels costos:

Material d'oficina

Material	Unitats	Cost unitari (€/Unitat)	Cost total (€)
Llibreta, bolígraf...	1	3	3
Impressió	3	24	63
Enquadernació	3	2	6
CD-R	3	3	9
Total			81

Material de laboratorii fungibile

Material	Unitats	Cost unitari (€/unitat)	Cost total (€)
Eppendorf	10	0,005	0,05
Vials GC	180	0,762	137,16
Taps vials GC	180	0,111	19,98
Filtres millex	340	0,468	159,12
Guants de làtex	0,25	5,66	1,415
Puntes de pipeta	680	0,001	0,68
Pipetes pasteur p	5	0,012	0,06
Pipetes pasteur v	9	0,047	0,423
Total			318,9

Compost	Quantitat(L)	Cost unitari (€/L)	Cost total (€)
Acid propionic	0,5	25,24	12,62
HCl	1	9,7	9,7
Total			22,32

Compost	Quantitat (Kg)	Cost unitari (€/L)	Cost total (€)
NH ₄ Cl	0,315	29,91	9,42
MgSO ₄	0,138285	16,69	2,31
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1323	31,14	4,12
ATU	0,01575	705,2	11,11
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,504	22,11	11,14
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,001485	33,16	0,05
H ₃ BO ₃	0,0001485	40,72	0,01
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0000297	33,9	0,00
KI	0,0001485	153,66	0,02
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,0001188	53,06	0,01
Na ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	0,0000594	267,78	0,02
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0001188	28	0,01
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0001485	186,8	0,03
KH ₂ PO ₄	0,17136	28,89	4,95
K ₂ HPO ₄	0,12978	41,06	5,33
NaHCO ₃	0,0945	15,56	1,47
NaOH	1	16,18	16,18
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0042	186,8	0,78
Total			66,94

Material de laboratori amortitzable

Material	Preu d'adquisició (€)	Vida útil (anys)	Cost proporcional (€)
Cromatograf de gasos	15.000	15	250
Planta pilot	18.000	15	300
Nevera	600	15	10
Micropipeta (x3)	150	5	8
Vials 40mL (x50)	100	4	6
Sonda temperatura	70	4	4
Sonda redox	230	4	14
Sonda pH	140	4	9
Sonda oxigen	1100	4	69
Balança	1.660	10	42
Material divers (Material de vidre)	100	5	5
Total			717

7.1.2. Despesa de personal

Cost total de personal; 2087.5 €

La despesa de personal assignada al projecte es calcula per a la fórmula:

Preu de l'hora treballada 7.15

Nombre d'hores treballades: 350

Pagament seguretat social 17%/mes

7.1.3. Energia

Cost energètic total; 269.71

Aquest càlcul és mol aproximat ja que s'han tingut en compte només aquells aparells molt utilitzat. Alguns aparells que s'han fet servir només una o dues vegades no s'han inclòs.

Aparell	Temps d'ús (h)	Consum aparell (W)	Energia consumida (kWh)	Cost energia (0.1€/kWh)**
PLC	2160	300	648	64,8
Agitador	1890	800	1512	151,2
Bombes	20	20	2	0,2
Nevera	2160	100	216	21,6
PHOSPHAX*	1080	200 (mitjana)	216	21,6
Cromatograf	50	2100	105	10,5
Total				269,71

* S'han comptabilitzat només el 50% de les hores, ja que l'aparell s'ha compartit amb altres grups de recerca.

**S'ha suposat aquest preu que es una mitjana dels preus ofertats actualment

7.2. Planificació del treball

Gener	Febrer				Març				Abril				Maig				Juny				Juliol			
Setmana																								
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4					
Documentació i planificació del projecte																								
Aprenentatge del funcionament del laboratori i quèips																								
Treball experimental																								
Experiment primer.				Experiment segon																				
								Tractament dels resultats obtinguts																
								Redacció del projecte																
				Presentació oral																				

7.3 Figures complementàries

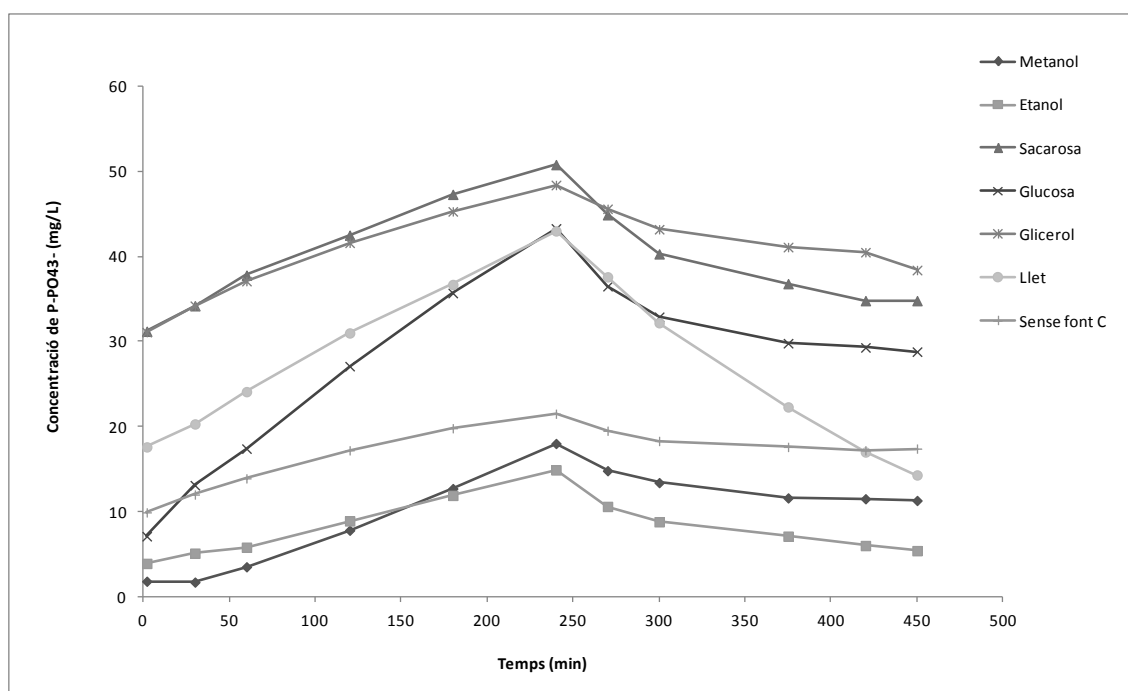


Figura 17: Concentració de fòsfor durant els cicles de seguiment dels experiments en discontinu amb biomassa PAO-propionic, utilitzant diferents fonts de carboni.

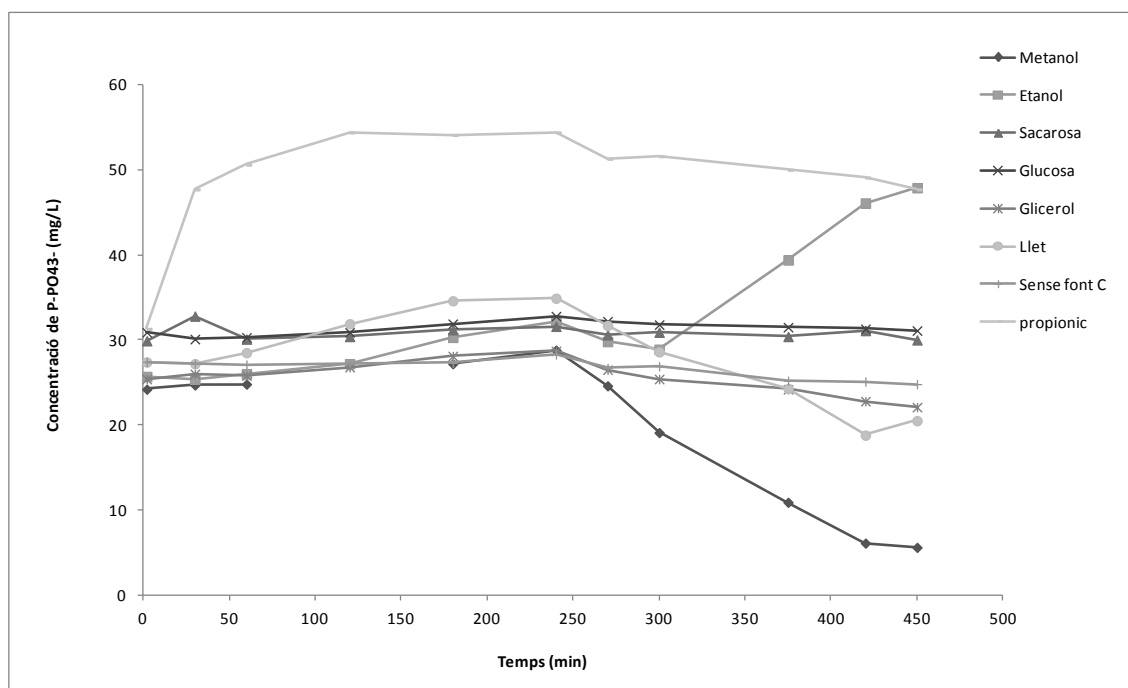


Figura 18: Concentració de fòsfor durant els cicles de seguiment dels experiments en discontinu amb biomassa del consorci, utilitzant diferents fonts de carboni.

7.4. Índex de figures i taules

Figura 1: Esquema del metabolisme dels microorganismes PAO

Figura 19: Subprocessos de transformació de la digestió anaeròbia

Figura 3: Funcionament del sistema d'SBR

Figura 20: Cromatograma d'anàlisi d'una mostra d'àcids grassos volàtils.

Figura 5: Funcionament del consorci PAO-digestió anaeròbia

Figura 6: Variacions de les concentracions de metanol i fòsfor al llarg d'un cicle.

Figura 7: Concentracions de metanol i fòsfor en els cicles seguits els dies 14è, 19è, 33è i 35è respectivament, després de la posada en marxa de l'experiment primer.

Figura 8: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 44è dia després de la posada en marxa de l'experiment primer, i dos dies posteriors a la formació del consorci PAO-digestió anaeròbia.

Figura 9: Concentracions de metanol i fòsfor en els cicles seguits els dies 4t (període 1), 9è(període 2), 11è(període 3) respectivament, després de la posada en marxa de l'experiment segon.

Figura 10: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 14è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i el primer fet després de la bioaugmentació de PAO en l'SBR A.

Figura 11: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 21è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i una setmana més tard després d'haver creat el consorci.

Figura 12: Concentracions de metanol i fòsfor del cicle seguit el 40è dia després de la posada en marxa de l'experiment segon, i 26 dies mes tard de la creació del consorci.

Figura 13: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle del seguit 26 dies després de la creació del consorci.

Figura 14: Foto dels microorganismes PAO (rosa)i GAO (blau) feta amb el microscopi confocal a una mostra dels llots de l'SBR A

Figura 15: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle en discontinu fet amb biomassa PAO-propiónic

Figura 16: Acumulació d' àcid hidroxibutíric, àcid hidroxivalèric i àcid 2-metil-hidroxivalèric durant el cicle en discontinu fet amb biomassa del consorci

Figura 17: Concentració de fòsfor durant els cicles de seguiment dels experiments en discontinu amb biomassa PAO-propionic, utilitzant diferents fonts de carboni.

Figura 18: Concentració de fòsfor durant els cicles de seguiment dels experiments en discontinu amb biomassa del consorci, utilitzant diferents fonts de carboni.

Taula 10: Concentracions límit de DBO, DBO5, SST, P i N en els efluent d'EDAR. Font: RD509/1996

Taula 2: Concentracions requerides per a la preparació dels medis sintètics dels SBR

Taula 3: Durada de cada una de les fases i períodes dels dos experiments realitzats

Taula 4: Duració dels períodes de l'experiment primer

Taula 5: Eliminació de fòsfor en els seguiments dels cicles del primer experiment.

Taula 6: Eliminació de fòsfor en els seguiments dels cicles del segon experiment.

Taula 7: Quantificació de les concentracions de les diferents espècies en els reactors A i B

Taula 8: Concentracions de fòsfor alliberat, captat i eliminat pels PAO en els experiments en discontinu abans del consorci

Taula 9: Concentracions de fòsfor alliberat, captat i eliminat pels PAO en els experiments en discontinu després del consorci

7.5. Acrònims i paraules clau

Acrònims

AGV Acids grassos volàtils

DBO Demanda Biològica d'Oxigen

DQO Demanda Quimica d'Oxigen

EBPR Enhanced Biological Phosphorus Removal / Eliminació biològica de fòsfor

EDAR Estació Depuradora d'Aigües Residuals

FID Flame ionization detector / Detector d'ionització de flama

GAO Glicogen Accumulating Organisms / Organismes acumuladors de glicogen

GC Gas chromatography / Cromatografia de gasos

OD Oxígen dissolt

PAO Polyphosphate Accumulating Organisms / Organismes acumuladors de fòsfor

PHA Polihidroxialcanoat

PLC Program Logic Control

RPM Revolucions per minut

SBR Sequencing Batch Reactor / Reactor discontinu seqüencial

SST Sòlid en Suspensió Totals

SSV Sòlids en Suspensió Volàtils

TRC Temps de residència cel·lular

TRH Temps de residència hidràulic

Paraules clau

Eliminació biològica de fòsfor, consorci, acidògens, acetògens, Polyphosphate Accumulating Organisms (PAO), metanol, acids grassos volàtils.